



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *Stricto sensu* EM CIÊNCIAS APLICADAS A
PRODUTOS PARA SAÚDE (PPG-CAPS)**

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DAS ESPÉCIES
VEGETAIS CABOVERDIANAS *Echium hypertropicum* Webb e
Echium stenosphon Webb subsp. *stenosphon***



José Carlos Borges de Carvalho

Niterói, 2013

**“ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DAS ESPÉCIES
VEGETAIS CABOVERDIANAS *Echium hypertropicum* Webb e
Echium stenosiphon Webb subsp. *stenosiphon*”**

José Carlos Borges de Carvalho

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPG-CAPS) da Universidade Federal Fluminense, como parte dos pré-requisitos para obtenção do grau de mestre. Área de Concentração: Desenvolvimento de Produtos para Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Machado Rocha
Co-Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Adriana Passos Oliveira

Niterói, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA

C331 Carvalho, José Carlos Borges de.

Estudo químico e biológico das espécies vegetais caboverdianas *Echium hypertropicum* Webb e *Echium stenosiphon* Webb subsp. *Stenosiphon*/ José Carlos Borges de Carvalho; orientador: Leandro Machado Rocha. ____Niterói, 2013.

109f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Fluminense, 2013.

1. *Echium* 2. Alcaloides da pirrolizidina 3. Planta medicinal 4. Distúrbio gastrointestinal I. Rocha, Leandro Machado II. Título

CDD 615.321

JOSÉ CARLOS BORGES DE CARVALHO

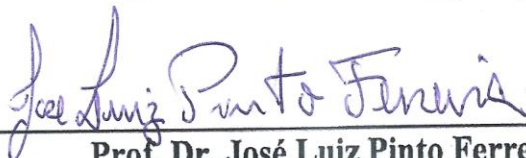
**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DAS ESPÉCIES VEGETAIS
CABOVERDIANAS *Echium hypertropicum* Webb e *Echium stenosiphon* Webb
subsp. *stenosiphon***

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Ciências Aplicadas a Produtos para
Saúde (PPG-CAPS) da Universidade
Federal Fluminense, como parte dos
pré-requisitos para obtenção do grau
de mestre. Área de Concentração:
Desenvolvimento de Produtos para
Saúde

Aprovado por:



Prof. Dr. Leandro Machado Rocha (Orientador)
Faculdade de Farmácia (UFF)



Prof. Dr. José Luiz Pinto Ferreira
Faculdade de Farmácia (UFF)



Prof. Dr. Marcelo Guerra Santos
Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UEFRJ)



Prof. Dr. Hildegardo Seibert França (Suplente e Revisor)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (IFES)

Niterói, 2013

Este trabalho foi realizado
sob a orientação do Prof. Dr.
Leandro Machado Rocha e
Co-Orientação da Prof.^a
Adriana Passos Oliveira.

DEDICATÓRIA

“... à minha família, que sempre me apoiou na tomada das minhas decisões e, mesmo distantes, sempre me deram o apoio moral para batalhar e atingir os meus objetivos...”

“A diferença básica entre um homem comum e um guerreiro é que um guerreiro toma tudo como desafio, enquanto um homem comum toma tudo como bênção ou como castigo...

... a maneira mais eficaz de se viver é como um guerreiro. Um guerreiro pode se preocupar e pensar antes de tomar uma decisão, mas uma vez que a tomou, segue seu caminho, livre de preocupações ou pensamentos; haverá mil outras decisões ainda à sua espera. Esta é a maneira de viver do guerreiro...

... um guerreiro aceita a responsabilidade de seus atos, mesmo os mais triviais. O homem comum nunca assume seus erros, mas assume qualquer vitória, mesmo que seja dos outros...”

Carlos Castañeda

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ter me dado a vida e a força para a realização desse trabalho.

Aos meus pais, Ivo e Alice, por todo amor, apoio e dedicação que sempre tiveram.

Aos meus irmãos e sobrinhos pelo apoio e incentivo.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Leandro Machado Rocha por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho e ter me recebido de braços abertos.

À minha Co-Orientadora Prof.^a Dr.^a Adriana Passos Oliveira pelo carinho e seus ensinamentos que me fizeram crescer e colher esse fruto.

À coordenadora do PPG-CAPS Prof.^a Kátia Lima por todo o suporte e ao colegiado do PPG-CAPS por terem me acolhido no programa.

Ao Prof. José Luiz Pinto Ferreira pelos conhecimentos, apoio e incentivo e participação como membro da banca.

Ao Eng. Manuel Leão Carvalho (Áreas Protegidas) pelo suporte e incentivo.

Ao Biólogo Samuel (INIDA) pelos conhecimentos e incentivo.

Ao Parque Natural de Monte Gordo, em especial à sua Diretora Lindaci Oliveira e aos Técnicos do Parque Ivani Duarte e Nelson Ramos pela dedicação e cooperação que sempre tiveram para que esse trabalho se concretizasse.

À Universidade Jean Piaget de Cabo Verde e à Inpharma (Inlab) pelo suporte laboratorial.

Ao Prof. Dilson e Hélio da Unipiaget pelo apoio.

À Prof.^a Marilena Cabral pela carta de recomendação.

Ao Prof. Marcelo Guerra pela ajuda com o depósito do material botânico e pela participação como membro da banca.

À Prof.^a Maria Denise Feder e seus alunos e ao Róber pela boa vontade e colaboração.

Ao Rafael Garrett pelos espectros de massa.

Ao Arthur e Mara pelos testes antibacterianos.

Ao LAREN-UFF pelos espectros de RMN.

À minha segunda família adquirida nesses dois anos: família LTPN.

Ao meu aluno de IC Henrique que sempre esteve disponível e ao Jonny pela ajuda na interpretação dos espectros de massa.

Às Professoras Dr.^a Maria Teresa Villela Romanos e Dr.^a Deborah Quintanilha Falcão pelos testes de atividade antiviral

Ao Prof. Dr. Hildegardo Seibert França pela revisão da dissertação e participação da banca.

Ao Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia da Faculdade Farmácia da UFF pelo suporte laboratorial.

A todos os amigos e familiares que com certeza contribuíram de alguma forma para o meu desenvolvimento pessoal e a realização desse trabalho.

Um agradecimento especial ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

RESUMO

CARVALHO, José Carlos Borges de. **Estudo químico e biológico das espécies vegetais caboverdianas *Echium hypertropicum* Webb e *Echium stenosphon* Webb subsp. *stenosphon***. Niterói, 2013. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense.

Echium hypertropicum Webb e *Echium stenosphon* Webb subsp. *stenosphon* são arbustos endêmicos de Cabo Verde, usados na medicina popular para o tratamento de distúrbios gastrointestinais e tosse. As duas espécies tiveram suas frações alcalóidicas obtidas por extração ácido-base. A análise por CG-EM e ESI-EM/EM indicou a presença de alcaloides pirrolizidínicos (APs) e as substâncias purificadas foram analisadas por experimentos de RMN de 1D e 2D. Um total de 10 alcaloides foram isoladas e identificadas, sendo que 8 identificadas através da comparação de suas massas moleculares e padrões de fragmentação de massas, com a base de dados NIST e os dados da literatura para o gênero. Os diésteres hepatotóxicos equimidana e 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina foram identificadas em ambas as espécies. Os alcaloides 7-seneciolretronecina, 9-angeloilretronecina, licopsamina, 7-acetil-licopsamina e equihumilina foram identificados nas folhas de *E. hypertropicum*, enquanto que o *N*-óxido da 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina foi identificado nas folhas de *E. stenosphon*. A equimidina foi o componente majoritário na fração em éter dietílico das folhas de *E. hypertropicum*, enquanto a 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina foi o componente majoritário na fração em diclorometano das folhas de *E. stenosphon*. O alcaloide 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina *N*-óxido foi identificado pela primeira vez no gênero *Echium*. Em adição, 22 componentes de óleo essencial foram identificadas nas flores de *Echium hypertropicum*, sendo *trans*-fitol (30,64 %), *n*-pentacosano (8,28 %) e *n*-tricosano (6,73) como componentes majoritários. O triterpeno friedelina foi também isolado das folhas de *E. hypertropicum*. Na avaliação da atividade antibacteriana, os extratos etanólicos das duas espécies vegetais e o alcaloide 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina foram capazes de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 com CMI de 250,0 µg/mL e 25,0 µg/mL, respectivamente. A atividade anticolinesterásica foi avaliada e a equimidina foi capaz de inibir a enzima acetilcolinesterase nas concentrações testadas com o valor de $P = 0,0011$. O alcaloide 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina retardou o crescimento do fitófago *Dysdercus peruvianus* na concentração de 1mg/mL. Os extratos etanólicos de *E. hypertropicum* e *E. stenosphon* (3,9 µg/mL) foram avaliados frente ao vírus HSV. O extrato etanólico de *E. hypertropicum* apresentou uma porcentagem de inibição (PI) de 27,5% contra HSV-1S e 43,8% contra HSV-2S. Apresentaram ainda elevada citotoxicidade para as células Vero, utilizadas como sistema hospedeiro (CC₅₀ de 140,10 µg/mL e 96,86 µg/mL). A composição química e as atividades biológicas de *E. hypertropicum* e *E. stenosphon* subsp. *stenosphon* foram relatadas pela primeira vez. As substâncias identificadas podem ser utilizadas no futuro como marcadores quimiotaxonômicos para o gênero *Echium*.

Palavras-chave: *Echium hypertropicum*, *Echium stenosphon*, alcaloides pirrolizidínicos, citotoxicidade, atividade antibacteriana, atividade antiviral.

ABSTRACT

CARVALHO, José Carlos Borges de. **Chemical and Biological studies of the capeverdian species *Echium hypertropicum* Webb and *Echium stenosphon* Webb subsp. *stenosphon***. Niterói, 2013. Master's dissertation (Master in Applied Sciences to Health Products), School of Pharmacy, Fluminense Federal University.

Echium hypertropicum Webb and *Echium stenosphon* Webb subsp. *stenosphon* are endemic capeverdian shrubs used in folk medicine for the treatment of gastrointestinal diseases and cough, respectively. The two species had their alkaloidal fractions obtained by acid-base extraction. GC-MS and ESI-MS/MS analysis indicated the presence of pyrrolizidine alkaloids (PAs) and purified substances were also analyzed by 1D and 2D NMR experiments. A total of 10 alkaloids were isolated and identified, which 8 were identified by comparing their molecular masses and mass fragmentation patterns with NIST database and literature data for the genus. The hepatotoxic diesters echimidine and 7-(2-methylbutyryl)-9-echimidinylretronecine were identified in both species. The alkaloids 7-senecierylretronecine, 9-angeloylretronecine, lycopsamine, 7-acetyl-lycopsamine and echiumiline were identified in the leaves of *E. hypertropicum*, whereas the 7-(2-methylbutyryl)-9-echimidinylretronecine N-oxide was identified in the leaves of *E. Stenosphon*. Echimidine was the major component in the diethyl ether fraction from leaves of *E. hypertropicum*, whereas the 7-(2-methylbutyryl)-9-echimidinylretronecine was the major component in dichloromethane fraction from leaves of *E. stenosphon*. The alkaloid 7-(2-methylbutyryl)-9-echimidinylretronecine N-oxide was identified for the first time in *Echium* genus. In addition, 22 essential oil components were identified in *E. hypertropicum* flowers, with *trans*-phytol (30.64%), *n*-pentacosane (8.28%) and *n*-tricosane (6.73%) as the major components. The triterpene friedelin was also isolated from *E. hypertropicum* leaves. The antimicrobial susceptibility tested with the ethanolic extract and the alkaloid 7-(2-methylbutyryl)-9-echimidinylretronecine against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 showed a MIC of 250.0 µg/mL and 25.0 µg/mL, respectively. The anticholinesterasic activity was evaluated and echimidine was able to inhibit the enzyme at the concentrations tested with *p* value = 0.0011. The alkaloid 7-(2-methylbutyryl)-9-echimidinylretronecine retarded the growth of phytophagous *Dysdercus peruvianus* at the concentration of 1mg/mL. For the antiviral activity, the ethanolic extracts from *E. hypertropicum* and *E. stenosphon* (3.9 µg/mL) were analyzed against HSV. The ethanolic extract of *E. hypertropicum* showed an inhibition percentage (IP) of 27.5% against HSV-1S and 43.8% against HSV-2S. Also showed high cytotoxicity for the Vero cells, used as host for the herpesvirus (CC₅₀ 140.10 µg/mL and 96.86 µg/mL). The chemical composition and biological activities of the leaves and flowers of *E. hypertropicum* and *E. stenosphon* subsp. *stenosphon* are reported for the first time. The identified pyrrolizidine alkaloids could be used in future as chemotaxonomic markers for *Echium* genus.

Keywords: *Echium hypertropicum*, *Echium stenosphon*, pyrrolizidine alkaloids, cytotoxicity, antibacterial activity, antiviral activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A- Localização Geográfica de Cabo Verde; B- Arquipélago de Cabo Verde	04
Figura 2. Estruturas químicas de alcaloides pirrolizidínicos.	12
Figura 3. Biossíntese de alcaloides pirrolizidínicos.	14
Figura 4. Mecanismo de toxicidade de APs.	16
Figura 5. Vias do metabolismo de APs. Fonte: Adaptado de IBRAHIM , 2007; WIEDENFELD e EDGAR, 2011.	19
Figura 6. Inibidores da AChE. A- rivastigmina, B- donepezila, C- galantamina.	22
Figura 7. <i>Echium hypertropicum</i> Webb.	25
Figura 8. <i>Echium stenosphon</i> Webb subsp. <i>stenosphon</i> .	26
Figura 9. A - Exsicata de <i>E. hypertropicum</i> Webb; B - Exsicata de <i>E. stenosphon</i> Webb subsp. <i>stenosphon</i>	28
Figura 10. Extração do óleo essencial no aparato do tipo Clevenger.	29
Figura 11. Processo de extração por maceração.	30
Figura 12. Fluxograma de obtenção das frações alcaloídicas (APs terciários).	32
Figura 13. Fluxograma de obtenção das frações alcaloídicas (APs totais) de <i>E. hypertropicum</i> .	33
Figura 14. Processo de extração por percolação.	34
Figura 15. 1- Coluna com Sephadex TM LH-20 da SFA1; 2- cromatograma com as frações idênticas; 3- Coluna Sephadex TM LH-20 das frações reunidas (ESc); 4 e 5 cromatograma das frações agrupadas da segunda coluna. Fase estacionária da CCD: gel de sílica; Fase móvel da CCD: tolueno/ acetato de etila/ dietilamina (70:20:10). Revelador: Dragendorff (4) e H ₂ SO ₄ 10% em MeOH (2 e 5).	39
Figura 16. Reação colorimétrica de formação do ácido tionitrobenzóico.	44
Figura 17. A- <i>D. peruvianus</i> no quarto estágio durante o processo de aplicação da droga. B- adulto de <i>D. peruvianus</i> .	44
Figura 18. A- ninfa do 5º estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> ; B – Adulto de <i>Rhodnius prolixus</i>	45
Figura 19. A e B- cromatograma das frações revelados com reagente de Dragendorff (A) e reagente de Mayer (B): 1- atropina, 2 – fração em éter de <i>E. hypertropicum</i> , 3 - fração em éter de <i>E. stenosphon</i> , sistema de eluente:	52

tolueno/ acetato de etila/ dietilamina (70:20:10); **C**- precipitação com reagente de Mayer: 1- fração em éter da *E. hypertropicum*, 2 - fração em éter da *E. hypertropicum* + reagente de Mayer, 3- Reagente de Mayer; **D** - precipitação com reagente de Mayer: 1- fração em éter da *E. stenosphon* + reagente de Mayer, 2 - fração em éter da *E. stenosphon*, 3- Reagente de Mayer.

Figura 20: Cromatograma das frações alcalóidicas: P- padrão de APs (uma das frações da coluna SephadexTM LH-20 da fração em éter de *E. hypertropicum*); ECH- fração em éter da *E. hypertropicum*; ECS- fração em éter da *E. stenosphon*; AcCH- fração em acetato de etila de *E. hypertropicum*; AcCS- fração em acetato de etila de *E. stenosphon*. Sistema de eluente: tolueno/ acetato de etila/ dietilamina (70:20:10). Fase estacionária: gel de sílica. 53

Figura 21. Cromatograma das frações: FA1- fração em éter; FA2- fração em diclorometano; FA3- fração em acetato de etila; FA4- fração em butanol. Sistema de eluente: tolueno/ acetato de etila/ dietilamina (70:20:10) para FA1 e FA2; acetato de etila/ tolueno/ dietilamina (70:20:10) para FA3 e acetona/ acetato de etila/ dietilamina (6:3:1) para FA4. Fase estacionária: gel de sílica. Revelador: Dragendorff. 54

Figura 22. Cromatograma da fração HFA1 de *Echium hypertropicum* obtido por CG-EM. 55

Figura 23. Padrão de fragmentação do EM da substância 1 obtido por CG-EM. 56

Figura 24. Fragmentação sugerida dos íons fragmentos da substância 1 (PAIVA, 2002; IBRAHIM, 2007; LIU *et al.*, 2009; PAVIA, 2012). 57

Figura 25. Estrutura química da 7-senecioldretronecina. 57

Figura 26. Padrão de fragmentação do EM da substância 2 obtido por CG-EM. 58

Figura 27. Formação sugerida para os íons fragmentos da substância 2 (2 (EL-SHAZLY *et al.*, 1996a; PAIVA, 2002; IBRAHIM, 2007). 59

Figura 28. Estrutura química de 9-angeloldretronecina. 59

Figura 29. Padrão de fragmentação do EM da substância 3 obtido por CG-EM. 60

Figura 30. Estrutura química de licopsamina. 60

Figura 31. Padrão de fragmentação do EM da substância 4 obtido por CG-EM. 61

Figura 32. Formação sugerida para os íons em m/z 180 e m/z 120 (EL-SHAZLY *et al.*, 1996a) 61

Figura 33. Estrutura química de 7-acetil-licopsamina 62

Figura 34. Padrão de fragmentação do EM da substância 5 obtido por CG-EM.	62
Figura 35. Formação proposta para os íons fragmentos da substância 5 (EL-SHAZLY <i>et al.</i> , 1996a; PAIVA, 2002; IBRAHIM, 2007).	63
Figura 36. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 5 .	65
Figura 37. Detalhes da estrutura da base necina da substância 5 com seus respectivos valores de δ de ^1H e ^{13}C .	66
Figura 38. Estrutura química - A e estruturas tridimensionais - B da equimidina mostrando a conformação do anel da base necina.	66
Figura 39. Padrão de fragmentação do EM da substância 6 obtido por CG-EM.	67
Figura 40. Formação proposta dos íons fragmentos da substância 6 (EL-SHAZLY <i>et al.</i> , 1996b; PAIVA, 2002; IBRAHIM, 2007). Setas azuis: mecanismo de formação dos íons m/z 136, 119, 93, 85, 59 e m/z 57. Setas pretas: mecanismo de formação dos íons m/z 222, 120, 94 e m/z 80.	68
Figura 41. Estrutura química da 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina.	69
Figura 42. Padrão de fragmentação do EM da substância 7 obtido por CG-EM.	69
Figura 43. Estrutura química da equihumilina.	69
Figura 44. Estrutura da base necina com os respectivos δ de ^1H .	71
Figura 45. Isômeros de substituintes angeloil conhecidos.	72
Figura 46. RMN de ^1H do substituinte angeloil encontrado para a substância 2 .	72
Figura 47. Espectro de massas (+)-ESI-Q-TOF EM da fração em diclorometano SFA1 da <i>Echium stenosphom subsp. stenosphon</i> .	73
Figura 48. ESI-MS/MS fragmentação da molécula protonada em m/z 400 $[\text{M}+\text{H}]^+$.	74
Figura 49. Estruturas sugeridas para os fragmentos mais abundantes da molécula protonada em m/z 400 $[\text{M}+\text{H}]^+$ observadas no ESI-MS/MS.	74
Figura 50. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da molécula protonada em m/z 400 $[\text{M}+\text{H}]^+$. f1- deslocamento químico.	76
Figura 51. ESI-MS/MS fragmentação da molécula protonada em m/z 398 $[\text{M} + \text{H}]^+$.	77
Figura 52. Estruturas sugeridas para os fragmentos mais abundantes da molécula protonada m/z 398 $[\text{M} + \text{H}]^+$ observada no ESI-MS/MS.	78
Figura 53. ESI-MS/MS fragmentação da molécula protonada em m/z 416 $[\text{M}+\text{H}]^+$.	79

Figura 54. Estrutura química de 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina <i>N</i> -óxido e da molécula protonada em m/z 416 $[M+H]^+$.	79
Figura 55. Cromatograma da substância 9 (Fried). P- padrão de friedelina. Sistema de eluente: hexano/acetato de etila (8:2); Revelador: vanilina sulfúrica; Fase estacionária: gel de sílica.	81
Figura 56. Cromatograma da substância 9 obtido no aparelho GCMS-QP5000.	82
Figura 57. Espectro de massas da substância 9 obtido pos ionização por impacto de elétrons.	82
Figura 58. Estrutura proposta dos íons fragmentos da substância 9 .	83
Figura 59. Espectro de RMN de 1H (500 MHz, $CDCl_3$) da substância 9 .	84
Figura 60. Espectro de RMN de ^{13}C APT (125 MHz, $CDCl_3$) da substância 9 . Picos para cima (CH_2 e C), picos para baixo (CH_3 e CH).	84
Figura 61. Estutura química da friedelina.	85
Figura 62. Microplaca do teste de susceptibilidade bacteriana com cepas de <i>S. aureus</i> ATCC 29213. ES- extrato etanólico de folhas de <i>E. stenosphon</i> subsp. <i>stenosphon</i> ; EH- extrato etanólico de folhas de <i>E.hypertropicum</i> ; AL 6- alcaloide 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina.	86
Figura 63. Regressão linear entre actividade da AChE (%) x logaritmo natural da concentração eficaz de eserina, equimidina, 7-(2-methylbutyryl)-9-echimidinylretronecina, extrato etanólico de <i>E. hypertropicum</i> e <i>E. stenosphon</i> subsp. <i>stenosphon</i> .	88
Figura 64. Percentual (%) de mortalidade e ecdise em <i>D. peruvianus</i> tratados com 1 μ L/inseto do alcaloide na concentração de 1 mg/mL.	89
Figura 65. Percentual (%) de mortalidade e ecdise em <i>D. peruvianus</i> tratados com 1 μ L de DMSO.	90
Figura 66. Percentual (%) de mortalidade e ecdise em <i>D. peruvianus</i> sem tratamento.	90
Figura 67. Substâncias identificadas em <i>E. hypertropicum</i> e <i>E. stenosphon</i> subsp. <i>stenosphon</i> .	95
Figura 68. Estruturas dos componentes do óleo essencial das flores de <i>E. hypertropicum</i> .	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Alcaloides pirrolizidínicos isolados de espécies de <i>Echium</i> .	13
Tabela 2. Intoxicação humana por APs.	18
Tabela 3. Composição química do óleo essencial de flores de <i>Echium hypertropicum</i> .	50
Tabela 4. Rendimento das frações alcaloídicas de <i>E. hypertropicum</i> e <i>E. stenosiphon</i> subsp. <i>stenosiphon</i> .	51
Tabela 5. Dados de deslocamentos químicos típicos de RMN de ^1H da base necina e valores observados no núcleo pirrolizidínico da substância 5 .	64
Tabela 6. Alcaloides pirrolizidínicos identificados no <i>E. hypertropicum</i> por GC-MS.	70
Tabela 7. Deslocamentos químicos característicos de ^1H para os três diferentes isômeros do substituinte angeloil.	72
Tabela 8. Dados de deslocamentos químicos típicos de RMN de ^1H da base necina e valores observados no núcleo pirrolizidínico da molécula protonada em m/z 400 $[\text{M}+\text{H}]^+$.	76
Tabela 9: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da literatura e da equimidina (5) e 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina (6).	80
Tabela 10: Triterpeno da <i>E. hypertropicum</i> obtido por GC-MS.	82
Tabela 11: Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância 9 , baseados na comparação com os dados da literatura para friedelina	85
Tabela 12. Resultados da análise do teste de atividade antiviral dos extratos etanólicos de folhas de <i>E. hypertropicum</i> e <i>E. stenosiphon</i> subsp. <i>stenosiphon</i> contra HSV-1S e HSV-2S.	91

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1D - unidimensional

2D - bidimensional

δ - deslocamento químico

μL - microlitro

AchE - acetilcolinesterase

ASCH - iodeto de acetilcolina

AI - Índice Aritmético

mACH - receptor muscarínico da acetilcolina

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APG - *Angiosperm Phylogeny Group*

APs - Alcaloides Pirrolizidínicos

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CG - Cromatógrafo em Fase Gasosa

CG-EM – Cromatografia com Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

DGA - Direção Geral do Ambiente

DMSO - dimetilsulfóxido

DTNB - 5,5'-Ditiobis(2-Ácido nitrobenzóico)

DVO - Doença veno-oclusiva

EM - Espectrometria de Massas

EUA - Estados Unidos da América

eV- elétron volt

ESI-EM/EM - Ionização por Eletrospray acoplado a Espectrometria de Massas.

ESI-Q-TOF EM- Ionização por Eletrospray acoplado a um analisador de massas com quadrupolo e tempo de voo.

FA₁ e FA₂- Frações alcaloídicas 1 e 2

FARM. BRAS- Farmacopeia Brasileira

HSQC - Correlação Heteronuclear Quantum-Simples

HMBC - Correlação Heteronuclear em Ligações Múltiplas

HSV-1S- Herpes vírus simples tipo 1

HSV-2S- Herpes vírus simples tipo 2

int. relat.- intensidade relativa

IPCS - International Program on Chemical Safety

kg - kilograma
Lit. - Literatura
MAAP - Ministério do Ambiente, Agricultura e Pesca
mg- miligrama
MHz- mega hertz
min. - minuto
mL - mililitro
 m/z - massa/carga
NAD⁺ - nicotinamida adenina dinucleótido
NADH- nicotinamida adenina dinucleótido
NIST- National Institute of Standards and Technology
OMS - Organização Mundial de Saúde
PBS - tampão de fosfato salino
Per. relat.- percentagem relativa
PNMG - Parque Natural de Monte Gordo
PNSM - Parque Natural de Serra Malagueta
p/p- peso por peso
ppm- partes por milhão
R_f - fator de retenção
RMN- Ressonância magnética nuclear
RMN 1D e 2D - Ressonância magnética nuclear unidimensional e bidimensional.
RMN ¹H- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³C- Ressonância magnética nuclear de carbono
Subst. - substância
SUS- Sistema Único de Saúde
T.A - Temperatura Ambiente
TRAMIL- Tradicional Medicina nas Ilhas
UK- United Kingdom (Reino Unido)
UV- Ultravioleta

SUMÁRIO

	1
1 INTRODUÇÃO	
1.1 O arquipélago de cabo verde (localização geográfica e clima)	4
1.2 A flora caboverdiana	5
1.3 A medicina popular em cabo verde	6
1.4 Considerações sobre a família Boraginaceae	7
1.5 Considerações sobre o gênero <i>Echium</i>	8
1.6 Alcaloides pirrolizidínicos	10
1.6.1. Propriedades e principais fontes dos alcaloides pirrolizidínicos	10
1.6.2 Estrutura química	12
1.6.3 Biossíntese	14
1.6.4 Toxidez	15
1.6.4.1 Mecanismo da toxidez	16
1.6.4.2 Metabolização hepática	19
1.6.4.3 Prevenção e tratamento das intoxicações	20
1.7 Atividades biológicas	21
1.7.1 Considerações sobre atividade antibacteriana	21
1.7.2 Considerações sobre atividade anticolinesterásica	22
1.7.3 Considerações sobre atividade inseticida	23
1.7.4 Considerações sobre atividade antiviral	24
1.8 Considerações sobre <i>Echium hypertropicum</i>	25
1.9 Considerações sobre <i>Echium stenosiphon</i> subsp. <i>stenosiphon</i>	26
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivos gerais	27
2.2 Objetivos específicos	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Obtenção do material vegetal	28
3.2. Extrações para <i>Echium hypertropicum</i>	29
3.2.1 Extração do óleo essencial	29
3.2.2 Obtenção do extrato etanólico	29
3.2.3 Extração ácido-base para obtenção das frações alcaloídicas	30
3.2.3.1 Alcaloides pirrolizidínicos terciários	30
3.2.3.2 Alcaloides pirrolizidínicos totais	31
3.2.4 Análise dos alcaloides no chá obtido de <i>E. hypertropicum</i>	31
3.3 Extrações para <i>Echium stenosiphon</i> subsp. <i>stenosiphon</i>	34
3.3.1 Obtenção do extrato etanólico	34

3.3.2 Extração ácido-base para obtenção das frações alcaloídicas	34
3.3.2.1 Alcaloides pirrolizidínicos terciários	34
3.3.3 Análise dos alcaloides no chá obtido de <i>E.stenosiphon</i>	35
3.4 Análise das frações alcaloídicas por cromatografia em camada delgada	36
3.5 Teste de Mayer para detecção de alcaloides	36
3.6 Isolamento dos metabólitos secundários	37
3.6.1 <i>Echium hypertropicum</i>	37
3.6.1.1 Alcaloides pirrolizidínicos terciários	37
3.6.1.2 Alcaloides pirrolizidínicos totais	37
3.6.1.3 Triterpeno	38
3.6.2 <i>Echium stenosphon</i> subsp. <i>stenosphon</i>	39
3.6.2.1 Alcaloides pirrolizidínicos terciários	39
3.7 Determinação estrutural	40
3.7.1 Análises por RMN	40
3.7.2 Análises por ESI-EM/EM	40
3.7.3 Análises por CG-EM	40
3.8 Avaliação das atividades biológicas	42
3.8.1 Atividade antibacteriana	42
3.8.2 Atividade anticolinesterásica- método quantitativo	43
3.8.3 Atividade inseticida	44
3.8.4 Atividade antiviral	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
4.1 Rendimento dos extratos etanólicos	49
4.2 Composição química do óleo essencial das flores da <i>Echium hypertropicum</i>	49
4.3 Rendimento das frações alcaloídicas	51
4.4 Identificação qualitativa dos alcaloides presentes nas frações alcaloídicas	52
4.5 Identificação de alcaloides nos chás de <i>E. hypertropicum</i> e <i>E. stenosphon</i>	52
4.6 Perfil cromatográfico das frações alcaloídicas de <i>E. hypertropicum</i> por CCD	53
4.7 Elucidação estrutural dos metabólitos secundários	55
4.7.1 Alcaloides da <i>Echium hypertropicum</i>	55
4.7.1.1 Alcaloides pirrolizidínicos terciários	55
4.7.1.2 Alcaloides pirrolizidínicos totais	71
4.7.2 Alcaloides da <i>E. stenosphon</i> subsp. <i>stenosphon</i>	73
4.7.2.1 Alcaloides pirrolizidínicos terciários	73
4.7.3 Triterpeno da <i>Echium hypertropicum</i>	81
4.8 Atividades biológicas	86
4.8.1 Atividade antibacteriana	86

4.8.2 Atividade anticolinesterásica- método quantitativo	88
4.8.3 Atividade inseticida	89
4.8.4 Atividade antiviral	91
5 CONCLUSÃO	93
6 REFERÊNCIAS	97

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas como meio de cura para uma determinada enfermidade é tão antiga quanto à existência do próprio homem. Todas as culturas estudadas, mesmo as mais primitivas, possuíam algum conhecimento do uso de plantas medicinais. Hoje em dia, a utilização de plantas na medicina tem uma grande importância a nível global, já que cerca de 80% da população mundial segundo a OMS se curam utilizando remédios tradicionais, principalmente à base de fitoterapia. Os restantes 20% utilizam medicamentos industrializados e de cada quatro medicamentos, um é à base de plantas (MORALES, 1996).

As plantas medicinais têm sido uma fonte rica para obtenção de moléculas a serem exploradas terapeuticamente. Muitas substâncias isoladas de plantas continuam sendo fontes de medicamentos como, por exemplo, os glicosídeos cardiotônicos, a quinina, a morfina, a hiosciamina, entre outras. No Brasil, alguns estudos revelaram que cerca de 20% da população consome 63% dos medicamentos industrializados. O restante da população encontra nos produtos de origem natural, especialmente as plantas, uma fonte alternativa de medicação (FOGLIO *et al.*, 2006).

O reino vegetal contém uma variedade de constituintes químicos que, em conjunto ou isoladamente, são responsáveis pela atividade farmacológica. A busca desses constituintes que pudessem explicar a ação farmacológica deles como um todo, fez com que os pesquisadores traçassem várias metodologias para o isolamento dos princípios ativos (LEITE, 2009).

As primeiras substâncias puras isoladas do reino vegetal foram datadas do século XIX com a extração principalmente de ácidos e bases orgânicas. Essas bases foram denominadas na época de alcaloides, por apresentarem propriedades semelhante às substâncias alcalinas (SANTOS e PINTO, 2012). A busca pela explicação da atividade curativa das plantas no século passado permitiu o isolamento de várias substâncias químicas que resultaram na descoberta de importantes drogas, como por exemplo a morfina (1817), analgésico muito potente, isolada do ópio da *Papaver somniferum*, a quinina (1821), um antimalárico isolado das cascas de *Chinchona spp* (LEITE, 2009), entre outras.

Não é surpreendente que drogas obtidas a partir de síntese química tenham ganho popularidade nas últimas décadas e se tornado a base da indústria farmacêutica. Ao longo dos anos, no entanto, drogas sintéticas têm sido responsáveis por efeitos colaterais, efeitos tóxicos ou mesmo têm sido ineficientes. O surgimento de ações iatrogênicas, o aparecimento de novos agentes infecciosos, a proliferação de doenças como o câncer e o aumento da

resistência microbiana a múltiplas drogas, têm renovado o interesse no estudo das plantas medicinais. Esses fatos fazem com que a fitoterapia seja agora globalmente aceita como um sistema alternativo de terapia reconhecida e preconizada pela OMS (LEITE, 2009; AHMAD *et al.*, 2006). Portanto, o reconhecimento do valor da fitoterapia como recurso clínico, farmacêutico e econômico, cresce progressivamente em vários países e o interesse da pesquisa com plantas tem aumentado nos últimos anos. Vários estudos em todo o mundo, especialmente na Europa, têm sido realizados para desenvolver conhecimentos científicos para dar uma base racional à fitoterapia, financiados por órgãos públicos e privados. Em países como China, Índia, Rússia e México, a medicina tradicional tem grande importância e, Cabo Verde não foge à regra. (MORALES, 1996; AHMAD *et al.*, 2006; COSTA, 2010).

No passado, a forma como desvendaram a virtude curativa das plantas, é algo difícil de imaginar. Nem sempre esses conhecimentos refletem ações curativas reais. Existem muitos usos que carecem totalmente de fundamentos ou o uso de plantas utilizadas quase que exclusivamente como placebos. Desta forma, estudos fitoquímicos e farmacológicos precisam ser realizados para garantir a segurança e a eficácia terapêutica no uso de fitoterápicos. Na China, por exemplo, existem mais de 500 jardins botânicos exclusivos de plantas medicinais e cerca de 5.000 espécies são utilizados por mais de 800 milhões de habitantes. No Caribe, o projeto TRAMIL (Programa de Investigação Científica de Plantas Medicinais) estuda o uso terapêutico das plantas pela população, onde as principais espécies são estudadas farmacologicamente e comparadas com o uso popular. O conhecimento científico é utilizado com o objetivo de melhorar e racionalizar as práticas medicinais populares (MORALES, 1996; TRAMIL, 2005).

No Brasil, com a introdução da fitoterapia no Sistema Público de Saúde (SUS), existe a necessidade de estudar plantas utilizadas pela população com intuito de garantir sua eficácia e segurança. Um dos exemplos para a realização desse objetivo é o Programa Farmácias Vivas do Ceará, que fez trabalhos baseados em revisar os dados químicos e farmacológicos das espécies de maior interesse publicado em literatura científica e seus usos terapêuticos, alertando a população e os profissionais de saúde quanto ao preparo e uso das plantas medicinais estudadas. Muitas das espécies utilizadas pela população coincidiram com os resultados encontrados na literatura, mostrando a importância do intercâmbio entre o conhecimento científico e o uso popular das plantas (VENDRUSCOLO *et al.*, 2005).

No ramo da fitoquímica ou das fitociências, os investigadores tentam determinar se as plantas usadas na medicina tradicional trazem benefícios para a saúde e, em caso afirmativo,

quais são os mecanismos de ação. Apesar da crença comum de que fitocompostos bioativos são seguros, existem riscos inerentes assim como todos os compostos químicos ativos (ELVIN-LEWIS, 2001). Os pesquisadores das fitociências trabalham para elucidar os efeitos colaterais, calcular as doses adequadas, identificar os componentes bioativos e definir os melhores métodos de extração e conservação. Além desses, os aspectos legais sobre a prescrição e comércio de plantas medicinais são tema de debate em todo o mundo (AHMAD *et al.*, 2006).

Na África, por exemplo, a medicina tradicional desempenha um papel extremamente importante. Nos últimos anos, esta questão foi tema de vários encontros nessa região do globo. Em 2000, o Comitê Regional Africano da OMS adotou a Resolução AF/RC50/R3 sobre “Promoção do Papel da Medicina Tradicional nos Sistemas de Saúde: Estratégia para a Região Africana”, com o objetivo de contribuir para a melhoria da Saúde para toda região, através da otimização do uso da medicina tradicional, incentivo aos governos para o reconhecimento da medicina tradicional e criação de políticas de regulamentação, promoção da investigação, cultivo e conservação de plantas medicinais, proteção dos direitos da propriedade intelectual, bem como a formação de recursos humanos para atuar na investigação de plantas medicinais. De 2000 a 2010, o continente africano teve um grande avanço na promoção da medicina tradicional: até 2010, 22 países realizavam investigação e desenvolvimento de medicamentos tradicionais para o paludismo, VIH/SIDA, drepanocitose, diabetes e hipertensão, usando as orientações da OMS. Outros quatro países incluíram os medicamentos tradicionais nos seus Formulários Nacionais de Medicamentos Essenciais; seis países criaram orientações para a proteção dos direitos da propriedade intelectual; oito países criaram bases de dados de praticantes de medicina tradicional, conhecimentos da medicina tradicional; oito países institucionalizaram programas de formação para praticantes de medicina tradicional; treze países criaram programas de formação para estudantes de ciências da saúde. Além disso, algumas Universidades da Comunidade Econômica dos Estados da África Ocidental, República Democrática do Congo, África do Sul e Tanzânia, incluíram a medicina tradicional nos programas curriculares dos cursos de farmácia e medicina. Apesar dos avanços, os países ainda enfrentam dificuldades como: carência de recursos financeiros e humanos; fraca capacidade de regulamentação e dados científicos insuficientes sobre a segurança, eficácia e qualidade dos medicamentos tradicionais. Estudos precisam ser realizados para garantir a segurança quanto ao uso das ervas medicinais pela população (OMS, 2011).

1.1 O arquipélago de Cabo Verde (localização geográfica e clima)

O arquipélago de Cabo Verde situa-se a 454 km da costa ocidental africana, entre os paralelos 15 e 17 Norte e a 2600 km de Natal, Brasil. É constituído por um conjunto de 10 ilhas e 13 ilhéus, que ocupam uma superfície terrestre de 4033,37 km² e uma Zona Econômica Exclusiva (ZEE) que se estende por cerca de 734 000 km² (Figura 1). Distinguem-se dois grupos de ilhas: Barlavento (Santo Antão, São Vicente, Santa Luzia, São Nicolau, Sal, Boa Vista e os ilhéus Branco e Raso) e Sotavento (Santiago, Maio, Fogo, Brava e os ilhéus Grande e Luís Carneiro). As ilhas têm origem vulcânica, com zonas montanhosas e vales cobertos de vegetação (FERNANDES, 2008; GOMES *et al.*, 2008).

O arquipélago de Cabo Verde possui clima tropical seco, ameno, caracterizado por uma temperatura média anual de 25°C, umidade relativa entre 20 e 60% e amplitudes térmicas baixas. O clima é fortemente influenciado pelas seguintes correntes atmosféricas: (1) Ventos alísios de Noroeste, responsáveis pela estação seca e fresca, entre Novembro e Julho; (2) Ventos de Sudoeste, monção do Atlântico Sul, dependente da Zona de Convergência Inter Tropical, que afeta a região entre Agosto e Outubro, a estação “úmida” e (3) Harmatão, o vento quente e seco que sopra entre Janeiro e Fevereiro (GOMES *et al.*, 2008).

Os ventos alísios, ao provocarem precipitação orográfica nas zonas mais altas, são responsáveis pela vegetação de Santo Antão, São Vicente, Santa Luzia, São Nicolau, Santiago, Fogo e Brava. O Harmatão, ao incidir nas ilhas de Sal, Boavista e Maio, confere-lhes a característica aridez. As ilhas apresentam diferentes quadros paisagísticos resultantes da combinação entre os fatores climáticos e o relevo (GOMES *et al.*, 2008).

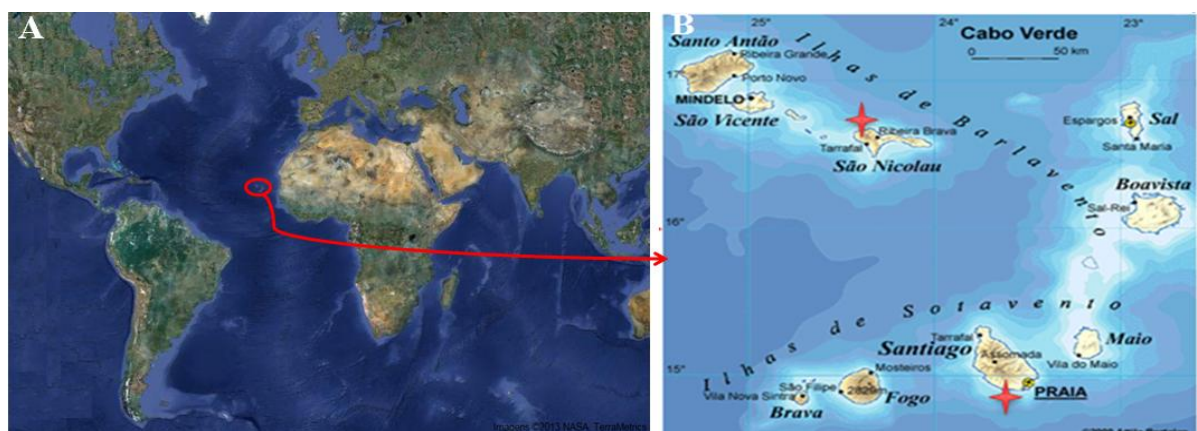


Figura 1. A- Localização Geográfica de Cabo Verde; B- Arquipélago de Cabo Verde. Fontes: A- <https://maps.google.com/>; B- <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/mapa-de-cabo-verde/mapa-3.php> (Acessados em 03/07/2012).

1.2 A flora caboverdiana

A flora do país é muito diversificada, resultante do cruzamento de plantas das zonas temperadas e das zonas quentes, tirando proveito do efeito moderador da altitude. Nesta diversificação, os descobrimentos tiveram influência determinante na introdução de plantas cultivadas, já que as ilhas serviram de “placa giratória” de plantas que eram trazidas e depois levadas para outras regiões pelos navegadores portugueses (GOMES *et al.*, 2008). Os elementos que compõem a flora foram originários de diversas regiões, principalmente das Macaronésias (Canárias, Madeira e Açores) e dos países africanos (Senegal, Gâmbia, Mauritânia e Marrocos) (MAAP/DGA, 2004).

A flora de Cabo Verde é formada por 224 espécies de angiospermas. Muitas delas sofreram modificações ao longo do tempo devido às condições especiais a que foram submetidas. Cerca de 85 delas são consideradas endêmicas e as restantes são espécies espontâneas aclimatadas que estão distribuídas entre onze famílias e dezessete gêneros. O gênero com maior representação é o *Diploaxis* (Mostarda-brabo), com oito espécies, seguido dos gêneros *Limonium* (Carqueja), *Lotus* (Piorno) e *Tornabenea* (Funcho) com cinco espécies. A família com maior diversidade específica é Asteraceae com dez espécies, entre as quais *Sonchus daltonii* Webb (Coroa-de-rei) e *Artemisia gorgonum* Webb (Losna), são as mais representativas (GOMES *et al.*, 2003, CARVALHO e ARAÚJO, 2006).

Cabo Verde é um país com elevado endemismo e encontra-se inserido num dos centros mais importantes do mundo para a diversidade vegetal que é a Bacia do Mediterrâneo. Esta bacia é considerada pela Conservação Internacional como um dos maiores Hotspot do mundo (MÉDAIL e QUÉZEL, 1999; PALAHI *et al.*, 2008). Devido ao desmatamento para a prática de agricultura, obtenção de combustíveis e uso na medicina tradicional, muitas espécies de plantas se encontram em perigo de extinção. (GOMES *et al.*, 2003, CARVALHO e ARAÚJO, 2006). Atualmente essas espécies são encontradas, na maioria das vezes, apenas em Áreas Protegidas, criadas para fins de preservação das espécies, denominadas Parques Naturais.

1.3 A medicina popular em Cabo Verde

No arquipélago de Cabo Verde, a relação entre a cultura humana e a utilização dos recursos naturais é extremamente forte, especialmente para as gerações mais antigas, que tinham uma maior ligação com a terra e seus recursos. Ainda é possível encontrar populações que têm conhecimento tradicional sobre o uso medicinal das plantas e que vão passando de geração a geração. Segundo o II Relatório Nacional sobre o Estado da Biodiversidade (2002), a aplicação de plantas na medicina tradicional remonta ao período inicial do povoamento das ilhas, devido ao fato dos escravos vindos da costa Ocidental da África, possuírem conhecimentos sobre as propriedades curativas de muitas plantas. É possível encontrar nos mercados em Cabo Verde quantidades consideráveis de espécies de plantas, muitas delas endêmicas e ameaçadas de extinção, utilizadas para a cura de certas doenças (ROQUE *et al.*, 2008).

Em Cabo Verde, as plantas medicinais constituem um componente fundamental do sistema de saúde, principalmente nas populações rurais das ilhas montanhosas, onde a assistência farmacêutica ainda é limitada. A proporção de pessoas que utilizam plantas medicinais é consideravelmente alta, seja por opção ou, em alguns casos, como único recurso (CARVALHO e ARAÚJO, 2006; ROQUE *et al.*, 2008).

As plantas nativas caboverdianas ainda não têm estudos que permitam a elaboração de monografias completas e modernas. As espécies são usadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança. A utilização dessas espécies se deve aos conhecimentos estritamente herdados e alguns posteriormente adquiridos, o que demonstra que em um país como Cabo Verde, com uma biodiversidade razoável, existe uma enorme lacuna entre a oferta de plantas e a existência de pesquisas. Até esta data, tivemos conhecimento de apenas um estudo com a composição química do óleo da semente das três espécies de *Echium* existente em Cabo Verde (GUIL-GUERRERO *et al.*, 2006). Desta forma, considera-se este um fator de grande incentivo ao estudo das espécies locais, visando o seu uso racional e sua utilização como fonte de recursos terapêuticos para a população local, pois o reino vegetal representa um vasto celeiro de moléculas a serem descobertas.

1.4. Considerações sobre a família Boraginaceae

A família Boraginaceae pertence ao grupo das Angiospermas, que inclui 2.213 espécies distribuídas em 145 gêneros (THE PLANT LIST, 2010) que vão desde árvores, arbustos a plantas herbáceas, com uma distribuição geográfica mundial. Estão mais presentes em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, poucas delas nas zonas temperadas do hemisfério Norte (CARVALHO, 1988; MELO e ANDRADE, 2007).

No Brasil, a família Boraginaceae está representada por nove gêneros e cento e vinte e cinco espécies. Os gêneros são: *Cordia* L., *Euploca* Nutt., *Heliotropium* L., *Lepidocordia* Ducke, *Moritzia* DC. ex Meisn., *Rotula* Lour., *Thaumatocaryon* Baill., *Tournefortia* L., *Varronia* P. Browne (MELO e LYRA-LEMOS, 2008; MELO *et al.*, 2012).

Em Cabo Verde, esta família é composta por nove espécies, distribuída em quatro gêneros (*Coldenia*, *Echium*, *Heliotropium* e *Trichodesma*). Os gêneros mais representativos são o *Heliotropium* com quatro espécies e o *Echium* com três espécies (MARTINS, 1995; GOMES *et al.*, 2003; FERNANDES, 2008; ROMEIRAS *et al.*, 2008).

A importância econômica da família Boraginaceae é devida ao interesse medicinal de alguns de seus gêneros. Como por exemplo, podemos citar os gêneros *Cordia* L., com atividade cicatrizante e emoliente (SAITO, 1986), *Heliotropium* L., utilizado como diurético em problemas renais (AGRA *et al.*, 2007, 2008; COSTA, 2010) e *Symphytum* L., utilizado como antiinflamatório e cicatrizante de uso tópico (ANVISA, 2004).

A família *Boraginaceae* é considerada de grande interesse por suas atividades farmacológicas e biológicas como antitumorais, antiúlcera, antimicrobiana, antifúngica, larvicida, antiinflamatória, analgésica, antileishmania, cicatrizante, antidepressiva entre outras (KUGELMAN *et al.*, 1976; DUTTA *et al.*, 1987; GONZALEZ *et al.*, 1993; RABBANI *et al.*, 2004; FREITAS, 2010; HOSSEINI e ABOLHASSANI, 2011). Esta família é também conhecida por comportar espécies com certo potencial de toxidez, principalmente devido à presença de alcaloides pirrolizidínicos considerados marcadores quimiotaxonômicos de determinados gêneros (MEDINA, 2006). O isolamento e a química desses alcaloides têm despertado o interesse de muitos cientistas na área de botânica, alimentos, química, toxicologia, taxonomia, entomologia, entre outras, não somente devido aos efeitos tóxicos, mas também devido aos efeitos terapêuticos em humanos e animais (MEHRABANI *et al.*, 2006; CREWS *et al.*, 2010).

1.5 Considerações sobre o gênero *Echium*

Echium L. é um gênero botânico com cerca de 66 espécies, pertencente à família Boraginaceae (THE PLANT LIST, 2010). As espécies deste gênero são nativas do Norte de África, África Austral, Europa, Arquipélagos da Macaronésia, Península Ibérica e Leste do Mediterrâneo (GIBBS, 1971). Muitas espécies são utilizadas como ornamentais, medicinais e florestais. Podem ser encontradas em todo o globo, onde o clima permita a sua sobrevivência (CHWIL e WERYSZKO-CHMIELEWSKA, 2011; AGUIAR, 2012).

Nas Ilhas da Macaronésia (Arquipélagos da Madeira, Açores, Canárias e Cabo Verde), este gênero é composto por 27 espécies endêmicas, no qual duas espécies estão na ilha da Madeira, três espécies nas ilhas de Cabo Verde e o restante nas ilhas Canárias. Nesta região, a taxonomia de *Echium* é complexa, devido à existência de um número elevado de Taxa (subespécie, variedades, etc). Em Cabo Verde, encontram-se as espécies: *E. hypertropicum* Webb, *E. stenosphon* Webb e *E. vulcanorum* A.Chev (ROMEIRAS *et al.*, 2008). A espécie mais abundante é a *Echium stenosphon* Webb que possui três subspécies (*glabrescens*, *lindbergii* e *stenosphon*), presente nas Ilhas do Norte (Santo Antão, São Vicente e São Nicolau) e encontrada a partir de 500 m de altitude. As outras duas espécies ocorrem somente no grupo de ilhas do Sul: *Echium hypertropicum* em Santiago e Ilha Brava, a partir de 700 m de altitude e *Echium vulcanorum* na Ilha do Fogo. A identificação das espécies foi realizada graças à Webb (1849) e Chevalier (1935) e a caracterização foi baseada na morfologia das folhas e flores (GOMES *et al.*, 2003; ROMEIRAS *et al.*, 2008; ROMEIRAS *et al.*, 2011).

Algumas espécies do gênero *Echium* foram citadas por vários autores como sendo responsáveis por propriedades medicinais importantes, como é o caso de *Echium amoenum* como antiviral (ABOLHASSANI, 2010), antibacteriana, antifebril, diurética, laxativa, emoliente (ABOLHASSANI, 2004), imunomoduladoras em Leishmaniose (HOSSEINI e ABOLHASSANI, 2011), antidepressiva (RABBANI *et al.*, 2004; ABOLHASSANI, 2004; GHOLAMZADEH *et al.*, 2007), estimulador da proliferação de linfócitos e inibidor da síntese de anticorpos humorais (AMIRGHOFRAH *et al.*, 2000), analgésico, anticonvulsivante (HEIDARI *et al.*, 2006a,b) e antioxidante (RANJABAR *et al.*, 2006); *Echium vulgare* como antioxidante e anti-hipertensivo (NAGAI *et al.*, 2012); *Echium rauwolfii* e *Echium horridum* como antibacteriano e antifúngico (EL-SHAZLY *et al.*, 1999)

e *Echium wildipretii* como “antifeedant” (SANTANA *et al.*, 2012). As substâncias químicas descritas para o gênero são: alcaloides pirrolizidínicos (MEHRABANI *et al.*, 2006; ALALI *et al.*, 2008), o ácido rosmarínico (MEHRABANI *et al.*, 2005a,b), saponinas, flavonoides, terpenoides insaturados e esteróis (GHOLAMZADEH *et al.*, 2007), além do ácido gama-linolênico (SPERLING *et al.*, 2001; GUIL-GUERRERO *et al.*, 2006) e ácido alfa-linoléico (SPERLING *et al.*, 2001).

Apesar do grande potencial apresentado pelas espécies do gênero *Echium*, as espécies caboverdianas ainda não foram alvo de estudos para o conhecimento de suas propriedades químicas e biológicas. Apenas um relato de GUIL-GUERRERO e colaboradores (2006) que identificou a presença do ácido gama-linolênico em óleos de sementes das três espécies de *Echium* pertencentes às ilhas de Cabo Verde, que podem ser utilizados como dietéticos. O uso das espécies caboverdianas do gênero *Echium* na medicina popular, aliada à escassez de estudos químicos e biológicos, forneceu os motivos principais para o desenvolvimento do presente estudo.

1.6 Alcaloides pirrolizidínicos (APs)

1.6.1. Propriedades e principais fontes de alcaloides pirrolizidínicos

Os alcaloides de um modo geral fazem parte de um grupo químico com atividade farmacológica muito importante, que vem sendo utilizados desde as civilizações mais antigas, que na época as utilizavam como medicamentos, poções mágicas ou venenos. Essas substâncias podem ser muito potentes, quer na sua forma natural ou como seu derivado sintético (EVANS, 2009; SOUZA *et al.*, 2012). Como exemplo, além da morfina e quinina citados anteriormente, podemos ainda citar a atropina (proveniente da *Atropa belladonna* L.), a hiosciamina e a escopolamina (*Hyoscyamus niger* L.) que apresentam atividade biológica como anticolinérgicos; a emetina (*Cephaelis ipecacuanha*) como emético e amebicida; a efedrina (*Ephedra sp*) como simpatomimético; a vimblastina e a vincristina (*Catharanthus roseus* (L.) G.Don) como antitumorais; a codeína como antitussígeno; a galantamina (*Galanthus nivalis* L.) como inibidor enzimático usado na Doença de Alzheimer, entre outros (DEWICK, 2002).

Os alcaloides pirrolizidínicos têm uma larga ocorrência nas plantas e, nas últimas décadas, o interesse por esses alcaloides também tem aumentado devido a efeitos terapêuticos como antimitótico, antitumoral, antiespasmódico e midriático (MATTOCKS, 1986). Entre outras atividades biológicas descritas na literatura até o momento, podemos citar a atividade antibacteriana (SINGH *et al.*, 2002), antifúngica (REINA *et al.*, 1995; REINA *et al.*, 1997; HOL e VAN VEEN, 2002; SINGH *et al.*, 2002), inibição enzimática (SCHEMELLER *et al.*, 1997; KATO *et al.*, 2003; KATO *et al.*, 2007), anti-ulcerogénico (citoprotetor) (TOMA *et al.*, 2004) e “antifeedant” (REINA *et al.*, 1995; REINA *et al.*, 1997; DOMÍNGUEZ *et al.*, 2008). Alguns estudos com ensaios de radioligantes ainda mostraram que certos alcaloides pirrolizidínicos apresentam afinidade com receptores importantes como o serotoninérgico (5HT-2) e acetilcolina muscarínico (mAChR) (SCHEMELLER *et al.*, 1997). Os APs estão envolvidos também com estratégias de defesa de vários insetos. Entre eles algumas espécies de insetos (geralmente borboletas) dos gêneros *Danaid*, *Arctiid*, *Itomiine*, *Utheisa* e *Lepidopterans* foram estudadas e verificou-se que durante o estágio de larva estes se alimentam das boragináceas dos gêneros: *Heliotropium*, *Tournefortia*, *Messerschmidia*, *Bothriospermum*, *Echium* e *Trichodesma*. Os APs presentes nessas espécies ficarão

acumulados nos insetos e servirão de repelente para os predadores (ROQUE-ALBELO *et al.*, 2002; HARTMANN *et al.*, 2004b).

Os alcaloides pertencentes a esta classe química têm sido isolados, identificados e detectados em plantas e animais, mas, a sua principal fonte são espécies pertencentes ao grupo das Angiospermas (BAH e PEREDA-MIRANDA, 2004). JOOSTEN e VAN VEEN (2011) relataram em seus estudos que as plantas produzem essas toxinas como possível mecanismo de defesa contra herbívoros e microorganismos, que pode ser tanto pela sua toxicidade como pelo seu gosto amargo. Alguns trabalhos relatam que cerca de 3% de plantas com flores no universo contêm alcaloides pirrolizidínicos tóxicos, representando risco para a saúde humana e dos animais (SMITH e CULVENOR, 1981). Esses alcaloides são encontrados em mais de doze das maiores famílias de plantas, sendo que os mais tóxicos estão concentrados em três famílias: Boraginaceae, Compositae (Asteraceae) e Leguminosae (Fabaceae). Mais de 660 alcaloides pirrolizidínicos e alcaloides *N*-óxidos pirrolizidínicos foram identificados em mais de 6.000 espécies das três famílias e cerca de metade deles apresentaram atividade tóxica que originou uma preocupação no mundo todo (STEGELMEIER *et al.*, 1999; ROEDER, 2000), pois, muitas espécies de plantas são utilizadas na medicina popular. Os gêneros descritos com maior atividade tóxica são: *Crotalaria*, *Heliotropium*, *Senecio*, *Echium*, *Trichodesma* e *Symphytum* (CREWS *et al.*, 2010).

Os alcaloides pirrolizidínicos foram relatados em algumas espécies pertencentes ao gênero *Echium* (tabela 1) usadas na medicina popular, nomeadamente: *Echium amoenum* Fisch. & C.A.Mey (MEHRABANI *et al.*, 2006), *Echium glomeratum* Poir. (ALALI *et al.*, 2008), *Echium vulgare* L. (EL-SHAZLY *et al.*, 1996a; BOPPRÉ *et al.*, 2005), *Echium setosum* (EL-SHAZLY *et al.*, 1996a), *Echium humile* (EL-SHAZLY *et al.*, 1996b) *Echium plantagineum* L. (CULVENOR, 1956; CULVENOR *et al.*, 1981 COLEGATE *et al.*, 2005), *Echium pininana* (ROEDER *et al.*, 1991), *Echium horridum* e *Echium rauwolfi* (EL-SHAZLY *et al.*, 1999).

1.6.2 Estrutura química

Os alcaloides pirrolizidínicos são ésteres de amino-alcoois derivados de núcleos heterocíclicos em que a estrutura básica compreende dois anéis de cinco membros unidos por um átomo de nitrogênio na posição 4, podendo ser saturados ou 1,2 insaturados (Figura 2). Esta estrutura é conhecida como base necina e podem ser do tipo retronecina ou otonecina. As ramificações nas posições 1 e 7 diferenciam os alcaloides pirrolizidínicos entre si, que podem ser de cadeia monocíclica ou bicíclicas (BAH e PEREDA-MIRANDA, 2004) (Figura 2). A ramificação com um ácido é denominado de ácido néxico. A hidrólise desse alcaloide origina um ácido néxico e uma base necina. Nas plantas, os alcaloides pirrolizidínicos podem estar na forma de mono-éster ou di-ésteres, podendo ser encontrados como uma mistura de base livre e seus *N*-óxidos, sendo este o mais predominante (CREWS, *et al.*, 2010). Os *N*-óxidos, após ingestão, se transformam na sua correspondente base livre, exercendo assim seu efeito tóxico (MATTOCKS, 1986; MOLYNEUX *et al.*, 1991). Entretanto, alguns autores acreditam que os *N*-óxidos apresentam a mesma toxicidade que suas correspondentes bases livres mas, por serem solúveis em água, no trato gastrointestinal tendem a ser eliminados mais facilmente (BAH e PEREDA-MIRANDA, 2004).

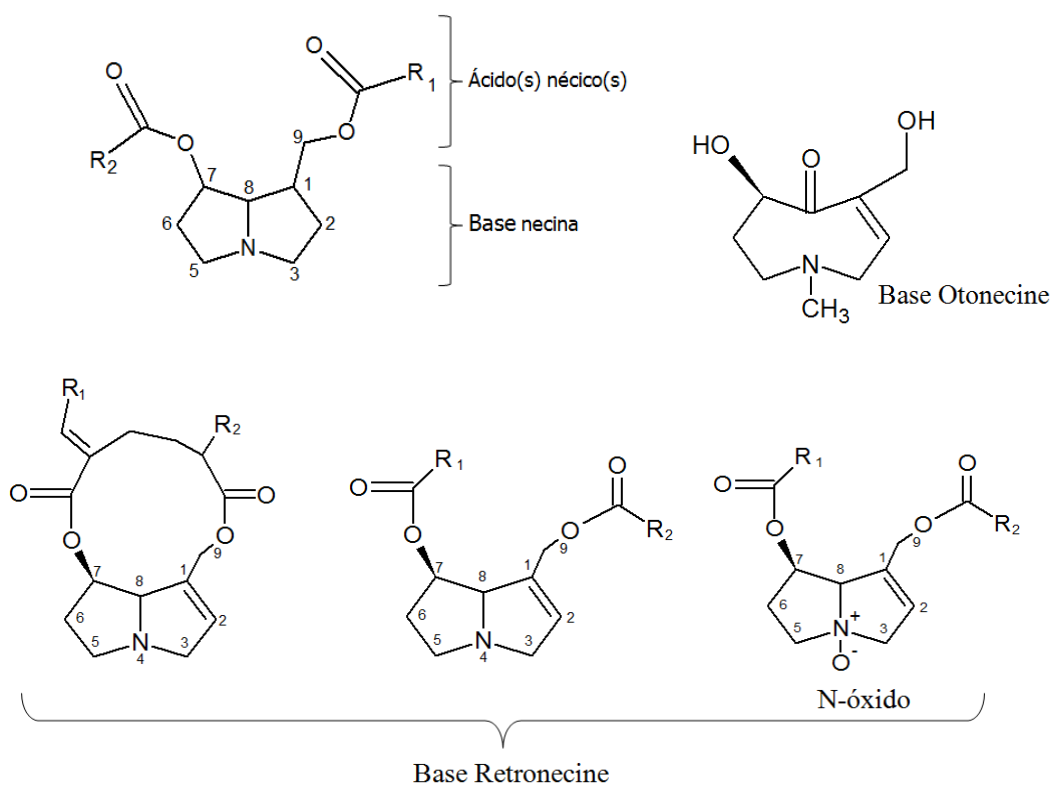


Figura 2. Estruturas químicas de alcaloides pirrolizidínicos.

Tabela 1: Alcaloides pirrolizidínicos isolados de espécies de *Echium*.

Alcaloides	Espécies								
	<i>E. amoenum</i>	<i>E. glomeratum</i>	<i>E. horridum</i>	<i>E. humile</i>	<i>E. pininana</i>	<i>E. Plantagineum</i>	<i>E. rauwolfii</i>	<i>E. setosum</i>	<i>E. vulgare</i>
Equimidina	+		+	+	+	+	+	+	+
Equimidina isomero (tigloil)	+		+				+	+	+
12-Acetil equimidina								+	+
Equihumilina				+				+	+
Equihumilina N-óxido				+					
Equiupinina					+				
Equiupinina N-óxido					+				
Equiumina						+			
Equinatina									+
Mioscorpina					+				
Mioscorpina N-óxido					+				
Hidroxi Mioscorpina					+				
Uplandicina			+			+	+	+	+
Intermidina						+			
7-Acetil intermidina					+	+			
Licopsamina			+	+		+	+		
7- Acetil-licopsamina			+	+		+	+		
7-Tigloil licopsamina			+				+		
7-Angelil licopsamina			+				+		
7-Senecioil licopsamina				+					
Retronecina							+	+	
7-Angelil retronecina	+	+	+			+	+	+	+
9-Angelil retronecina		+				+		+	+
7-Tigloil retronecina	+		+				+	+	+
9-Tigloil retronecina								+	+
7-Senecioil retronecina				+					
9-Senecioil retronecina				+					
7- Angelil 9-(2-metil butiril) retronecina			+				+		
7- Tigloil 9-(2-metil butiril) retronecina			+				+		
7- Angelil 9-(2,3-dihidroxi butiril) retronecina			+				+	+	+
7- Tigloil 9-(2,3-dihidroxi butiril) retronecina			+				+	+	+
7-(2-Metil butiril) 9-(2,3-dihidroxi butiril) retronecina				+				+	+
7-(2-Metil butiril) 9-equimidinil retronecina				+					
7-(2-Metil butiril) retronecina				+				+	+
9-(2-Metil butiril) retronecina								+	+
(7S, 8R)-petranina		+							
(7S, 8S)-petranina		+							
(7R, 8R)-petranina		+							
(7R, 8S)-Petranina		+							
*Referências	8	1	5	7	9	2,3,4	5	6	6

¹ALALI *et al.*, 2008; ²COLEGATE *et al.*, 2005; ³CULVENOR, 1956; ⁴CULVENOR *et al.*, 1981;

⁵EL-SHAZLY *et al.*, 1999; ⁶EL-SHAZLY *et al.*, 1996a; ⁷EL-SHAZLY, 1996b, ⁸MEHRABANI *et al.*, 2006; ⁹ROEDER *et al.*, 1991. Fonte: adaptado de MEHRABANI *et al.*, 2006.

1.6.3 Biossíntese

O esqueleto pirrolizidínico bicíclico tem origem a partir de duas moléculas de ornitina, tendo como intermediário a putrescina (Figura 3). Duas moléculas de putrescina sofrem uma condensação dependente do NAD^+ por uma reação de desaminação oxidativa para formar a imina, que é então convertida em homospermidina pela redução por NADH. Pode-se prever que uma molécula de putrescina possa ser convertida em aldeído pela desaminação oxidativa que, por sua vez, condensa com uma segunda molécula de putrescina para dar a imina, mas, este mecanismo tem sido provado ser incorreto. O esqueleto da pirrolizidina seria então formado a partir da homospermidina por uma sequência de reações de desaminação oxidativa, formação da imina e reação intramolecular de Mannich, na qual explora o ânion enolato gerado a partir do aldeído. Uma estrutura típica e simples de pirrolizidina natural é a da retronecina, que pode ser derivada do aldeído pirrolizidina por etapas envolvendo oxidação e redução. O esqueleto da pirrolizidina assim incorpora uma unidade de N-C4 de ornitina e outros quatro átomos de carbono a partir do mesmo aminoácido precursor (DEWICK, 2002).

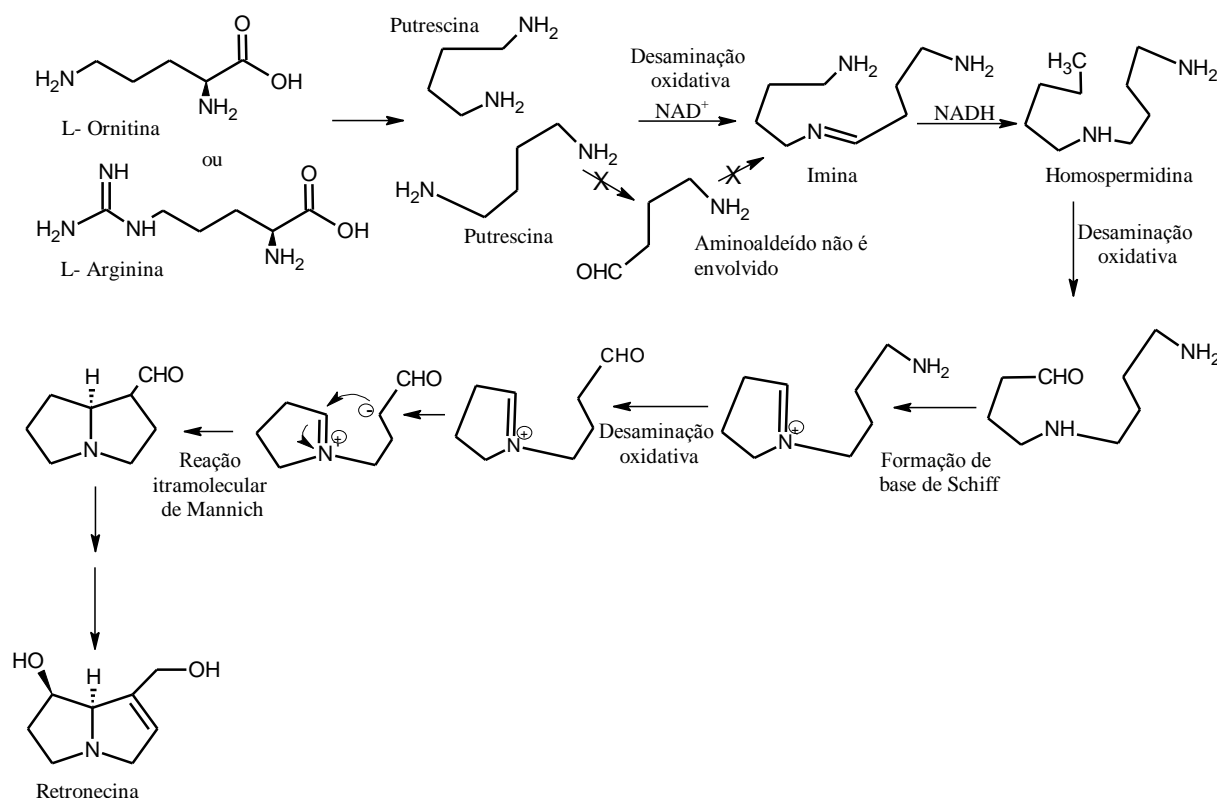


Figura 3. Biossíntese de alcaloides pirrolizidínicos (DEWICK, 2002).

1.6.4 Toxidez

Os alcaloides pirrolizidínicos são descritos como sendo hepatotóxicos, carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos (FU *et al.*, 2002; MEHRABANI *et al.*, 2006; MATTSSON, 2007; ZAMANSOLTANI *et al.*, 2008) e pneumotóxicos (CULVENOR *et al.*, 1976).

A literatura cita muitos casos de intoxicação humana acidental e de animais devido ao consumo de plantas ricas em alcaloides pirrolizidínicos ou produtos contaminados com esses alcaloides. Essas intoxicações humanas estão relacionadas com a ingestão de cereais, saladas, mel de abelha e leite bovino e caprino contaminado com alcaloides pirrolizidínicos e também pelo uso de plantas medicinais contendo essa classe de substância. No caso de animais, as intoxicações estão relacionados ao consumo de pastos, o que constitui um problema de saúde pública, principalmente nos países subdesenvolvidos. Estes fatos tem despertado a atenção de vários países e organismos regionais e internacionais como União Europeia, OMS, Organização Mundial do Meio Ambiente, Organização Internacional do Trabalho, entre outros, no sentido de alertar a população quanto ao consumo humano e de animais de espécies contendo essa classe de alcaloides (FU *et al.*, 2002; BAH e PEREDA-MIRANDA, 2004; WIEDENFELD e EDGAR, 2011). As ervas usadas na medicina tradicional geralmente apresetam poucas análises quanto à sua toxicidade, contrariamente ao que acontece com os fármacos sintéticos (HARTMANN *et al.*, 2004a; SUTER, 2006; SMART *et al.*, 2011).

Nos últimos 25 anos, a busca por uma dieta balanceada aliada ao produto natural e “seguro” tem aumentado o consumo de suplementos alimentares à base de plantas, acarretando o aumento na exposição às toxinas, principalmente nos países industrializados, algo que no passado acontecia apenas nos países do terceiro mundo (WIEDENFELD e EDGAR, 2011). VAN DEN BERG e colaboradores (2010), estudaram os níveis de substâncias genotóxicas e carcinogênicas em suplementos alimentares de plantas e concluíram que mais de 30 substâncias isoladas apresentaram potencial risco de genotoxicidade e/ou carcinogenicidade, sendo os alcaloides pirrolizidínicos um grupo químico dos mais representativos.

Na Alemanha, em 1992 depois de uma avaliação de risco detalhada pelos Serviços de Saúde, regulamentos foram estabelecidos para plantas contendo alcaloides pirrolizidínicos tóxicos ou os seus *N*-óxidos, restringindo a sua utilização por via oral. A dose estabelecida em preparações de ervas foi de 0,1 µg / dia, não mais que seis semanas por ano, com exceção de gestantes e lactantes, que não podem consumir a referida planta. Os níveis de exposição e a quantificação de tais alcaloides constituem um desafio (STEGELMEIER *et al.*, 1999;

COLEGATE *et al.*, 2005). No Brasil, a agência sanitária recomendou que preparações contendo confrei (*Symphytum officinale*) seja exclusivamente para o uso tópico (ANVISA, 2004).

1.6.4.1 Mecanismo da toxidez

De um modo geral, a toxicidade de todos os APs são semelhantes, mas sua potência varia de acordo com sua bioativação no fígado por oxidases para metabólitos tóxicos, chamado de pirróis (Figura 4) e de suas propriedades físicas como a hidrofobicidade, lipofilicidade e farmacocinética (HOOPER, 1978, FU *et al.*, 2004; WIEDENFELD e EDGAR, 2011). Alguns estudos relatam que a presença de uma insaturação entre o carbono 1 e 2 e esterificação com um ácido numa das hidroxilas na posição 7 ou 9 são os responsáveis pela toxicidade. Um estudo com animais demonstrou que os efeitos tóxicos estão mais relacionados aos produtos do metabolismo hepático do que ao próprio alcaloide pirrolizidínico (BAH e PEREDA-MIRANDA, 2004). Estes pirróis são poderosos agentes alquilantes que reagem com proteínas celulares importantes e com o DNA, causando disfunção celular, mitose e em alguns casos necrose tecidual (HOOPER, 1978). O principal dano no organismo acontece primeiramente no fígado e é conhecida como doença veno-oclusiva do fígado (DVO), caracterizada clinicamente por uma dor epigástrica e distensão abdominal (PRAKASH *et al.*, 1999).

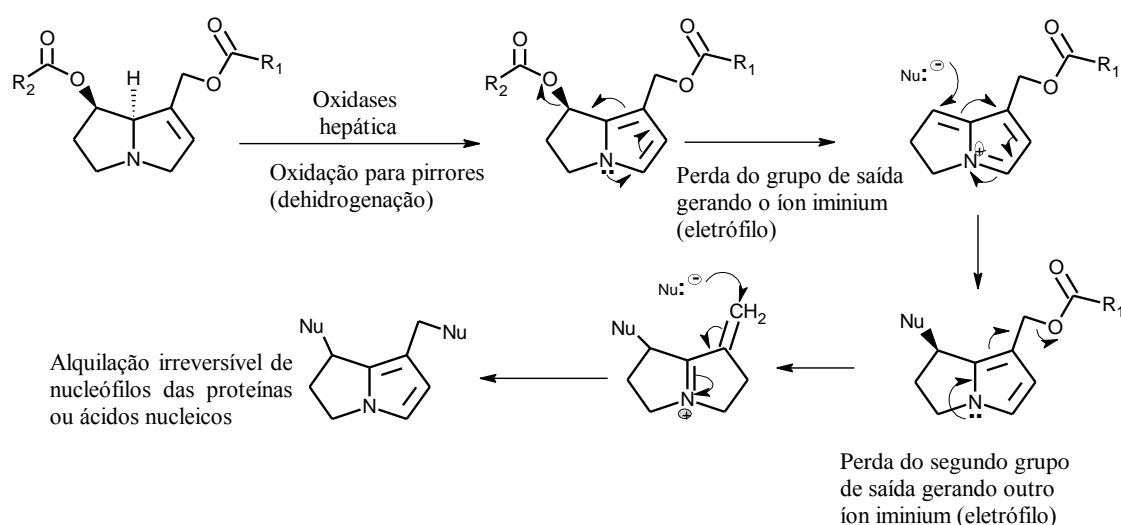


Figura 4. Mecanismo de toxicidade de APs. Fonte: Adaptado de DEWICK, 2002.

As lesões histológicas típicas verificadas no fígado devido a ligações cruzadas entre APs/DNA e APs/proteínas foram: aumento e/ou necrose dos hepatócitos, necrose periportal, megalocitose (aumento das células do parênquima), cariomegalia (aumento do núcleo), fibrose, proliferação de ductos biliares, fibrose vascular e oclusão. Foi ainda observado que as células aumentaram de 10-30 vezes o tamanho normal e o DNA teve seu conteúdo aumentado cerca de 200 vezes. Outros sistemas do organismo também são afetados quando ocorre um intoxicação por APs e tanto o plasma sanguíneo como as células vermelhas podem ser considerados transportadores dessas fitotoxinas e seus metabólitos reativos no organismo (PANTER, *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2011). Alterações similares foram observadas em ratos alimentados com uma dieta contendo 0,001-1% de *Senecio jacobae* (PRAKASH *et al.*, 1999).

Os efeitos de APs no organismo é dose-dependente e, as consequências de uma exposição podem variar de uma intoxicação aguda a subaguda e crônica. As manifestações clínicas de uma intoxicação aguda podem variar de horas a dias ou semanas e é relacionada a ingestão de grandes quantidades de APs, enquanto que a intoxicação crônica geralmente está relacionada com exposição a pequenas doses por um longo período de tempo. As intoxicações agudas se caracterizam por uma hepatomegalia, ascite, necrose hemorrágica ao redor do tecido onde ocorreu a bioativação e, em alguns casos a morte por falência hepática, ou passar para a fase subaguda. A doença veno-oclusiva geralmente ocorre na fase subaguda e muitas vezes, a cirrose associada pode confundir com outras doenças hepáticas. A fase crônica caracteriza-se por uma cirrose mais acentuada e fibrose (IPCS, 1988, 1989; BEGA, 2008). A tabela 2 mostra o relato de alguns casos de intoxicação humana por APs.

Tem sido relatados que os ruminantes possuem uma baixa susceptibilidade para intoxicação com APs por possuírem microrganismos no seu trato digestivo que convertem esses alcaloides em metabólitos não tóxicos. Neste caso, os vitelos, ovelhas e cabras precisam de doses muito elevadas de PAs para ocasionar uma intoxicação aguda, sendo que os casos relatados estão mais relacionados com uma intoxicação crônica (LANIGAN e SMITH 1970; LANIGAN, 1971).

Tabela 2. Intoxicação humana por APs.

Local e ano	Pessoas afetadas	Danos observados	Fonte de AP
África do Sul, 1920	11 adultos	Dor abdominal, vômitos e cirrose.	<i>Senecio illicifolius</i> , <i>S. burchelli</i>
Jamaica, 1954	23 adultos	DVO	Chás com <i>Crotalaria fulva</i>
África do Sul, 1968	15 crianças, 10 mortes	DVO	Chás com <i>Crotalaria</i> sp.?
Venezuela, 1969	Uma menina de 5 anos	DVO	<i>Crotalaria anagyroides</i> , <i>C. pumila</i> consumidas como infusão e como sopa de legumes
Kuwait, 1970	Adulto	Carcinoma do fígado	<i>Heliotropium ramosissimum</i> (‘‘Ramram’’)?
Jamaica, 1970	6 crianças	DVO	Chás de <i>Crotalaria</i> e <i>Senecio</i> sp.
Iraque, 1970	9 crianças	DVO	Alimentos contaminados com espécies de <i>Senecio</i>
Afeganistão 1970-1972	7200 pessoas	DVO	Trigo contaminado com <i>Heliotropium popovii</i> , ssp. <i>Gillianum</i>
Índia, 1973	486 pessoas	DVO	Cereais contaminados com <i>Crotalaria</i> spp.
Equador, 1973	Uma mulher	DVO	Chá de erva com <i>Crotalaria juncea</i> .
Índia, 1973, 1975	4 homens	Ascite endêmica	Painço contaminado com <i>Crotalaria</i> spp.
China, 1973, 1978	2 adultos	DVO	<i>Gynura segetum</i>
Martinica, 1975	2 crianças	DVO	Chás com <i>Crotalaria retusa</i> e/ou <i>Heliotropium</i> SP.
EUA, 1976, 1977	4 crianças	Congestão venosa e necrose do fígado	<i>Senecio longilobus</i>
Reino Unido, 1976	Uma mulher	DVO	Mate (chá do Paraguai) contaminado com AP de origem desconhecida.
EUA, 1984	Mulher de 49 anos	DVO	Suplemento alimentar contendo raiz de <i>Symphytum</i> spp.
China, 1985	4 mulheres	DVO	Chá de erva contendo <i>Heliotropium lasiocarpum</i>
Suíça, 1985	Homem de 59 anos e filho de 27 anos	DVO	Chá de erva contendo <i>Senecio</i> spp.
Suíça, 1986	Bebê de 5 dias de vida	DVO	Chá de erva contendo <i>Tussilago farfara</i> consumida durante o período da gravidez.
Reino Unido, 1986	Menino de 13 anos	DVO	Chá de ervas contendo <i>Symphytum</i> spp.
Tajiquistão, 1992, 1993	3906 pessoas	Dor abdominal, hepatomegalia, ascite, alteração da consciência.	<i>Heliotropium lasiocarpum</i>
Peru, 1994	Mulher de 38 anos	DVO	Chá de <i>Senecio tephrosioides</i>
Espanha, 1995	Homem de 73 anos	DVO	<i>Senecio vulgares</i>
Áustria, 1995	Menino de 18 meses	DVO	Chá de erva com <i>Adenostyles alliariae</i> .
Argentina, 1999	Mulher de 23 anos	DVO	Chá contendo <i>Senecio vulgares</i> .
Alemanha, 2002	Feto	DVO	<i>Symphytum</i> spp.

Fonte: WIEDENFELD e EDGAR, 2011.

1.6.4.2 Metabolização hepática

Os APs na forma de base livre geralmente são inertes e, ao serem ingeridos a maioria sofre eliminação via trato gastrointestinal e apenas uma pequena porção é metabolizada. O principal órgão do metabolismo é o fígado, mas existe algum relato de que uma pequena parcela tem sido metabolizada nos rins e pulmões (PRAKASH *et al.*, 1999; DEWICK, 2002). Existem três principais vias pelos quais os APs podem ser metabolizados (Figura 5). Uma das vias é a hidrólise do éster pela esterase originando alcoois dehidronecinas solúveis em água, permitindo que os metabólitos provoquem danos em regiões extra-hepáticos (IPCS, 1989). Esse pode também ser um provável mecanismo de desintoxicação, por elas serem solúveis em água e de fácil eliminação na urina (WIEDENFELD e EDGAR, 2011). A segunda via do metabolismo é a formação do pirrol pelas enzimas do citocromo P450 que estão associados com a citotoxicidade dos APs. O sistema pirrólico formado facilmente gera um eletrófilo, o íon carbónium ou iminium como mostrado na Figura 5, o que faz com que a molécula seja altamente reativa na presença de nucleófilos teciduais, como proteínas e ácidos nucleicos (CULVENOR *et al.*, 1970; PRAKASH *et al.*, 1999). Esses nucleófilos podem ser grupos hidroxilas e aminas de proteínas, grupos aminas de bases purina e pirimidina de DNA e RNA e ainda grupos SH de enzimas como glutatona, cisteína, etc., relatados por alguns autores como metabólitos envolvidos em processos de desintoxicação por APs (NIGRA e HUXTABLE, 1992; LIN *et al.*, 1998;). A terceira e última via é a formação de *N*-óxidos pela enzima monooxigenase P450, um dos principais produtos de oxidação formado pelo metabolismo hepático de APs, produto este considerado como um meio de desintoxicação para estas fitotoxinas.

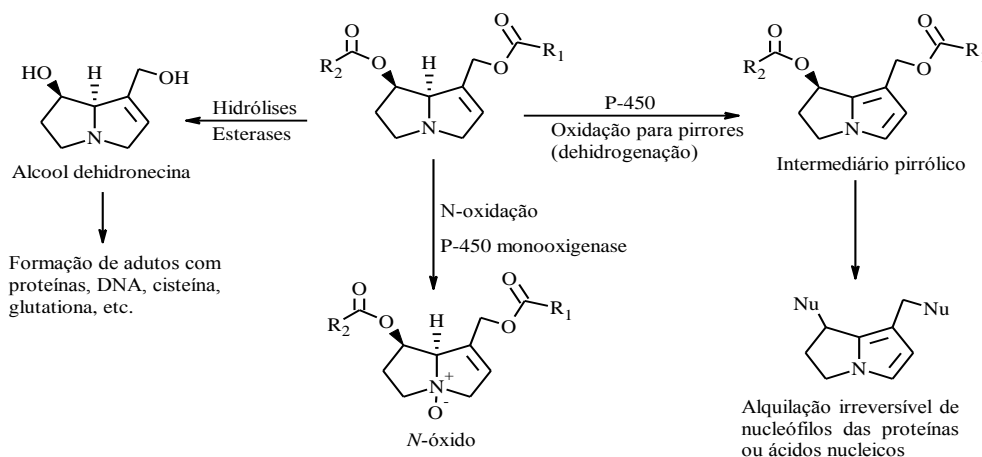


Figura 5. Vias do metabolismo de APs. Fonte: Adaptado de IBRAHIM , 2007; WIEDENFELD e EDGAR, 2011.

1.6.4.3 Prevenção e tratamento das intoxicações por APs

A prevenção e o tratamento das intoxicações causadas por APs não apresentam ainda um método eficaz. Estudos tem demonstrado que os antioxidantes, como o butilhidroxitolueno (BHT) e a etoxiquina, aumentaram as enzimas de desintoxicação tais como glutathione-S-transferase e epóxido hidrolase (PANTER, *et al.*, 2007). De acordo com a OMS (IPCS 1989), evitar a exposição aos APs é o único método eficaz de diminuir a toxicidade. A exposição aos APs deve ser evitada ou minimizada, tanto quanto possível. Mesmo o uso de doses baixas durante um longo período de tempo pode apresentar um risco para a saúde (IPCS, 1988). Alguns países como a Alemanha, Austrália, Áustria, Brasil, Canadá, Estados Unidos da América, Holanda, Indonésia, Nova Zelândia e Rússia, possuem atualmente regulamentos quanto ao uso de plantas ou preparações contendo APs, na medicina, na alimentação ou no pasto. (IPCS, 1989; STEGELMEIER *et al.*, 1999; ANVISA, 2004; COLEGATE *et al.*, 2005; WIEDENFELD e EDGAR, 2011). Desta forma, se faz necessário realizar estudos sobre a composição química, toxidez e regulamentação do uso de espécies vegetais ricos em APs, em outros países que também utilizam estas espécies na medicina popular, como ocorre em Cabo Verde, visando o uso seguro pela população.

1.7 Atividades biológicas

1.7.1 Considerações sobre atividade antibacteriana

O advento da resistência bacteriana a drogas de origem sintética tem levado à busca por produtos naturais, em especial espécies vegetais, como novas fontes de agentes antibacterianos, pois muitas plantas são relatadas como responsáveis por atividades contra bactérias. Atualmente, muitos trabalhos vêm sendo realizados em busca de novas espécies com atividade antimicrobiana (MICHELIN *et al.*, 2005). FERREIRA e colaboradores (2006) observaram que o extrato etanólico bruto de *Ipomoea cairica* (Convolvulaceae) foi ativo contra *Staphylococcus aureus*. Estudos de OLIVEIRA (2011), com diferentes extratos de *Sideroxylon obtusifolium* (Sapotaceae) mostraram que as mesmas apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. As principais classes químicas responsáveis pela atividade antibacteriana foram: alcaloides, cumarinas, flavonoides e terpenoides (NOSTRO *et al.*, 2000).

A família Boraginacea apresenta alguns gêneros, como *Cordia*, *Echium* e *Heliotropium*, descritos por apresentarem atividades contra vários microorganismos, incluindo as bactérias e fungos. KLOUCEK e colaboradores (2007) relataram que *Cordia alliodora* apresentou um MIC que varia 0,5 a 2,0 mg/mL contra os microorganismos testados, incluindo bactérias Gram positivas e Gram negativas. ABOLHASSANI (2004, 2010) e MEHRABANI e colaboradores (2005a) relataram em seus estudos que o extrato aquoso de flores de *Echium amoenum* apresentou resultados positivos contra a *Staphylococcus aureus* 8327 e, que pode estar associado à presença do ácido rosmarínico, conhecido por sua atividade antibacteriana. SINGH e colaboradores (2002) realizaram um estudo com alcaloides pirrolizidínicos isolados de *Heliotropium subulatum* (Boraginaceae) e constataram que estes apresentaram atividades contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Escherichia coli*.

1.7.2 Considerações sobre atividade anticolinesterásica

O mal de Alzheimer é considerado a causa mais comum de demência senil na idade avançada e está relacionada à diminuição da concentração do neurotransmissor acetilcolina (ACh) no cérebro, e pela ação da enzima acetilcolinesterase (AChE). É uma doença neurodegenerativa, cujas principais manifestações resultam na deficiência progressiva de cognição e incapacitação. Cerca de 10% dos indivíduos com idade superior a 65 anos e 40% das acima de 80 anos são afetadas por essa doença (SERENIKI e VITAL, 2008).

Um dos grandes avanços no tratamento sintomático dessa doença consiste na administração de inibidores da AChE, aumentando a disponibilidade da ACh no córtex cerebral, aumentando os estímulos aos receptores nicotínicos e muscarínicos da acetilcolina existentes no Sistema Nervoso Central (MARSTON *et al.*, 2002; GROSSBERG, 2003).

Os inibidores da AChE aprovados para uso clínico são: rivastigmina, donepezila e galantamina (BLENNOW *et al.*, 2006) (Figura 6).

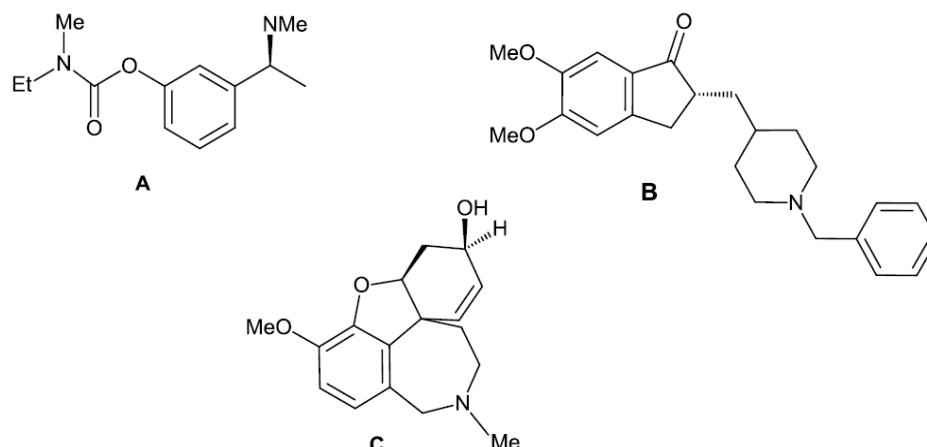


Figura 6. Inibidores da AChE. A- rivastigmina, B- donepezila, C- galantamina. Fonte: Oliveira, 2011.

As plantas são descritas como fontes de substâncias ativas com atividade anticolinesterásicas, como alcaloides, glicosídeos, xantonas e terpenos (MUKHERJEE *et al.*, 2007). A galantamina, fármaco utilizado na terapêutica, é um alcaloide obtido da espécie *Galanthus nivalis* (Amaryllidaceae). Outros alcaloides têm demonstrado possuir atividades consideráveis sobre essa enzima, como é o caso do estudo de ZHANG e colaboradores (2002) com a droga huperzina, um alcaloide extraído da planta *Huperzia serrata* (Lycopodiaceae), que mostrou ser um inibidor potente, específico e reversível da acetilcolinesterase em portadores da doença de Alzheimer. Desta forma, os alcaloides são substâncias promissoras para a descoberta de novos inibidores da acetilcolinesterase.

ORHAN e colaboradores (2011) realizaram estudos com espécies vegetais da família Boraginaceae e descreveram que o extrato clorofórmico da raiz de *Arnebia densiflora* apresentou leve inibição da enzima AChE na concentração de 62,5 µg/mL, que pode estar relacionada ao flavonoide shinkonina, presente em grande quantidade no gênero.

Apesar de extratos de plantas serem considerados importantes fontes de substâncias com atividade anticolinesterásica (MUKHERJEE *et al.*, 2007), a pesquisa desta atividade em plantas do gênero *Echium* é quase inexistente.

1.7.3 Considerações sobre atividade inseticida

O reino vegetal é uma fonte rica de substâncias com as mais variadas atividades biológicas. Muitas plantas produzem substâncias que podem atuar como inseticida seja matando o inseto ou atuando como repelente (FREITAS, 2010). Algumas espécies com atividade inseticida têm sido relatadas na literatura, como é o caso de *Eugenia sulcata*, cujos óleos essenciais das folhas e caules apresentaram uma potente atividade contra os insetos *Oncopeltus fasciatus*, *Dysdercus peruvianus* (praga do algodão) e *Rhodnius prolixus* (vetor da doença de Chagas) (LIMA, 2012). Algumas substâncias isoladas, como alcaloides, terpenoides e acetogeninas, têm sido relatadas por apresentarem atividade inseticida (VIEIRA *et al.*, 2007).

A atividade inseticida foi relatada para a família Boraginaceae, onde o óleo essencial de algumas espécies de *Cordia* apresentou atividade larvicida contra larvas de *Aedes aegypti* (vetor da dengue), que constitui um problema de saúde pública principalmente nos países onde o mosquito é endêmico (FREITAS, 2010). SANTANA e colaboradores (2012), mostraram em seus estudos que extrato etanólico, ésteres de ácidos graxos e fitoesteróis isolados de *Echium wildipretii* apresentaram uma potente atividade “antifeedant” contra alguns insetos. Outro estudo realizado por REINA e colaboradores (1997) mostrou que alguns alcaloides pirrolizidínicos isolados de *Heliotropium floridum* (Boraginaceae) apresentaram uma grande atividade “antifeedant” contra os insetos *Leptinotarsa decemlineata*.

A utilização de substâncias naturais extraídas de plantas no controle de pragas e insetos causadores de doenças se torna cada vez mais imperativo, devido à resistência a inseticidas sintéticos. Embora as plantas sejam consideradas fontes promissoras de novos inseticidas, até o presente a pesquisa desta atividade em espécies caboverdianas do gênero *Echium* ainda não foi avaliada.

1.7.4 Considerações sobre atividade antiviral

O Herpesvírus, também conhecido como vírus Herpes Simplex (HSV), pertence à família Herpesviridae, por apresentar características genômicas, sorológicas, ciclo replicativo e latência típica desta família de vírus (MIRANDA *et al.*, 2002, ABRANTES, 2006). O Herpesvírus pode ser classificado como do tipo 1 (HSV-1) e do tipo 2 (HSV-2). São genomicamente semelhantes, mas possuem algumas proteínas específicas que os diferenciam. A transmissão do HSV-1 geralmente ocorre por contato direto ou indireto, através de gotículas da orofaringe, objetos contaminados com saliva infectada ou com fluídos da lesão vesicular. Já no HSV-2, a transmissão é realizada por contato sexual, orogenital ou através de infecção genital da mãe para o recém-nascido. Existe um determinado tropismo do Herpesvírus pelos nervos sensoriais, onde permanecem no estado de latência pelo resto da vida do hospedeiro (FALCÃO, 2007).

O HSV-1 pode causar tanto o herpes labial quanto o herpes genital. A infecção geralmente é assintomática e, quando sintomática manifesta-se por lesões monocutâneas labiais e, em alguns casos pode causar encefalite e ceratoconjuntivite em pacientes imunocomprometidos (ABRANTES, 2006). O HSV-2, geralmente causa apenas herpes genital, também conhecido como herpes febril. Após a entrada no hospedeiro, o HSV-2 permanece no estado de latência próximo ao local de entrada. Em geral, manifesta-se com lesões eritematosas, ulcerações e reepitelização nas regiões genitais masculinas e femininas, precedido de febre, mialgias e cefaléias. Essas lesões podem aumentar o risco de transmissão de outras DST, inclusive HIV (PENELLO, 2010).

O tratamento consiste basicamente na inibição do DNA-polimerase do Herpesvírus, evitando assim a replicação viral. Os antivirais de eleição são os análogos de nucleosídeos, como o aciclovir e o ganciclovir (RANG *et al.*, 2007). Recentemente, algumas cepas de HSV-1 isoladas de imunocomprometidos, demonstraram certa resistência ao aciclovir, além de apresentarem certa toxicidade neural, renal e medular (LYON *et al.*, 2002; ABRANTES, 2006).

A resistência de algumas cepas, associados á toxicidade relatada dos medicamentos, tem incentivado a busca de novas substâncias, principalmente de origem vegetal, para o tratamento das infecções por Herpesvírus. Portanto, vários estudos têm sido feito nesse sentido, como exemplo, o trabalho realizado por FALCÃO (2007), que avaliou a atividade de diferentes extratos, substâncias isoladas e formulações, a partir de *Calceolaria chelidonioides*, com ótimos resultados frente ao Herpesvírus. Os óleos essenciais obtidos de algumas espécies

vegetais têm se tornado objeto de estudo, com bons resultados frente ao HSV-1 e HSV-2 (ORHAN *et al.*, 2012; LIMA, 2012).

ABOLHASSANI (2010) avaliou o extrato aquoso de *Echium amoenum*, espécie tradicionalmente utilizada no tratamento de doenças infecciosas, influenza e tratamento da febre e apresentou atividade antiviral *in vitro*. MEHRABANI e colaboradores (2005a) afirmaram que esta atividade antiviral pode estar associada ao ácido rosmarínico presente nesta espécie e descrito na literatura como agente antiviral.

1.8 Considerações sobre *Echium hypertropicum*

A espécie *Echium hypertropicum* é um arbusto muito ramificado, até 2,5 m de altura. Apresenta ramos jovens cobertos de pelos compridos e rígidos e folhas lanceoladas, alargada até 20 cm de comprimento e 5 cm de largura. Possui inflorescência densa com pequenas flores esbranquiçadas, arroxeadas ou azuladas (GOMES *et al.*, 2003) (Figura 7). Para maiores detalhes, consultar MARTINS (1995).

Na medicina tradicional caboverdiana, a espécie *Echium hypertropicum* é popularmente conhecida como "Língua-de-vaca" ou "Língua-di-baca" e utilizada na medicina popular para o tratamento de dor de estômago, cólicas abdominais, febre, hemorróida e também utilizada como dietético (MARTINS, 1995; GOMES *et al.*, 2008, GOMES *et al.*, 2003; GUIL-GUERRERO *et al.*, 2006).



Figura 7. *Echium hypertropicum* Webb. Fonte: próprio autor

1.9 Considerações sobre *Echium stenosiphon* subsp. *stenosiphon*

A espécie vegetal *Echium stenosiphon* subsp. *stenosiphon* é encontrada no seu habitat como um arbusto com até 1 m de altura. Apresenta caule acastanhado coberto de pelos compridos e rígidos ou quase sem pelos e folhas ovadas ou lanceoladas com até 10 cm de comprimento e 5 cm de largura, geralmente quase arredondadas no vértice. Possui inflorescência com poucas flores. (GOMES *et al.*, 2003) (Figura 8). Para maiores detalhes, consultar MARTINS (1995) e ROMEIRAS e colaboradores (2011).

Nas ilhas ao norte do arquipélago de Cabo verde, a espécie *Echium stenosiphon* subsp. *stenosiphon*, popularmente conhecida como "Língua-de-vaca" ou "Língua-di-baca" tem sido utilizados no preparo de xarope para tosse (MARTINS, 1995; GOMES *et al.*, 2008, GOMES *et al.*, 2003) e chá para bronquite.



Figura 8. *Echium stenosiphon* Webb subsp. *stenosiphon*. Fonte: PNMG

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Realizar o estudo fitoquímico e avaliar as atividades biológicas das espécies caboverdianas *Echium hypertropicum* e *Echium stenosphon* subsp. *stenosphon*.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar a composição química do óleo essencial obtido das flores da *E. hypertropicum* por cromatografia com fase gasosa acoplada ao detector de massas;
- ✓ Determinar a presença de alcaloides presentes nos chás de *E. hypertropicum* e *E. stenosphon* após extração ácido-base e análise por cromatografia em camada fina;
- ✓ Isolar os alcaloides presentes em *E. hypertropicum* e *E. stenosphon* através de uma combinação de métodos cromatográficos;
- ✓ Determinar a estrutura química dos alcaloides presentes nas duas espécies caboverdianas de *Echium* através de métodos espectroscópicos;
- ✓ Avaliar as seguintes atividades biológicas:
 - Atividade antibacteriana dos extratos etanólicos das duas espécies e da substância 6;
 - Atividade anticolinesterásica dos extratos etanólicos das duas espécies e das substâncias 5 e 6;
 - Atividade inseticida da substância 6;
 - Atividade antiviral dos extratos etanólicos das duas espécies;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material vegetal

As folhas de *Echium hypertropicum* e *Echium stenosphon* subsp. *stenosphon* foram coletadas em Fevereiro e Dezembro de 2011, enquanto que as flores de *E. hypertropicum* foram coletadas em Janeiro de 2012. A espécie *E. hypertropicum* foi coletada nas localidades de Biscaínhos e Serra Malagueta, Município do Tarrafal, Ilha de Santiago. A espécie *E. Stenosphon* foi coletada na Floresta do Parque Natural de Monte Gordo, Ilha de São Nicolau. A coleta e herborização das espécies *E. hypertropicum* e *E. stenosphon* subsp. *stenosphon* (Figura 9) foi realizada pelo autor do presente trabalho e pelos Técnicos do Parque Natural de Monte Gordo (PNMG) Ivani Duarte e Nelson Ramos.

As exsicatas foram depositadas no Herbário da Faculdade de Formação de Professores da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (RFFP), sob os números de registros RFFP-13.798 e RFFP-13.799 para *E. hypertropicum* e *E. stenosphon*, respectivamente.



Figura 9. A - Exsicata de *E. hypertropicum* Webb; B - Exsicata de *E. stenosphon* Webb subsp. *stenosphon*. Fonte: próprio autor.

3.2 Extrações para *Echium hypertropicum*

3.2.1 Extração do óleo essencial

A extração do óleo essencial das flores de *Echium hypertropicum* foi realizada por hidrodestilação em um aparato do tipo Clevenger (Figura 10). Para tal, uma mistura das flores frescas (200,0 g) obtidas de três espécimes de *Echium hypertropicum* foram turbilhonadas com água destilada e, em seguida colocadas em um balão de 2,0 L contendo fragmentos de porcelana porosa para regularizar a ebulição, adicionando quantidade de água suficiente para cobrir todo material vegetal. Em seguida, o balão foi adaptado ao aparato do tipo Clevenger e a condensador, sendo então aquecido em manta térmica, realizando-se assim a hidrodestilação por um período de 4 horas a partir da coleta da primeira gota do destilado. Ao final da extração, o óleo foi coletado com auxílio de diclorometano por apresentar pouca massa e acondicionado em geladeira para posterior realização da análise química.

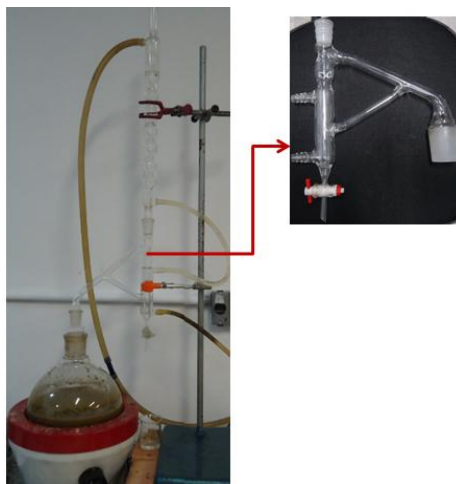


Figura 10. Extração do óleo essencial no aparato do tipo Clevenger. Fonte: próprio autor.

3.2.2 Obtenção do extrato etanólico

As folhas de *Echium hypertropicum* foram submetidas ao processo de secagem à sombra em temperatura ambiente (25 °C) pelo período de aproximadamente 20 dias. Após, cerca de 5,6 kg de folhas foram fragmentadas em moinho de martelo e o material resultante (5,5 kg) foi submetido ao processo de extração por maceração com 12,0 L de etanol comercial (96 °GL) (Figura 11) durante 7 dias com agitação diária. A solução etanólica obtida foi

filtrada em papel de filtro e o filtrado concentrado em evaporador rotatório sob vácuo, obtendo assim o extrato etanólico.



Figura 11. Processo de extração por maceração. Fonte: próprio autor.

3.2.3 Extração ácido-base para obtenção das frações alcaloídicas

3.2.3.1 Alcaloides pirrolizidínicos terciários

O extrato etanólico de *E. hypertropicum* (45,0 g) foi agitado durante 15 min com 670 mL de H_2SO_4 0,1N, no qual foi solubilizado parcialmente e depois filtrado em papel de filtro. O papel de filtro foi lavado com H_2SO_4 0,1N até completar o volume do filtrado para 800 mL. Em seguida, o filtrado foi particionado com CH_2Cl_2 (3 x 100 mL). A fração em diclorometano obtida apresentou resultado negativo após análise com o reagente de Dragendorff, indicando a ausência de alcaloide. A fração aquosa remanescente foi transferida para um erlenmayer e alcalinizada com NH_4OH até valor de pH 10 e em seguida particionada sucessivamente com éter dietílico (5 x 250 mL), diclorometano (5 x 100 mL), acetato de etila (3 x 100 mL) e butanol (4 x 250 mL), fornecendo as frações em éter **HFA1** (60,0 mg), em diclorometano **HFA2** (38,3 mg), em acetato de etila **HFA3** (11,2 mg) e em butanol **HFA4** (2,1 g). A metodologia utilizada está descrita no fluxograma ilustrado na Figura 12 (WAGNER e BLADT, 1996). As frações obtidas foram analisadas qualitativamente por CCD, segundo a metodologia também descrita por WAGNER e BLADT (1996).

3.2.3.2 Alcaloides pirrolizidínicos totais

O extrato etanólico de *Echium hypertropicum* (203,0 g) foi agitado durante 15 min com 350 mL HCl 2 N e após, 20 g de Zn em pó foi adicionado aos poucos e agitado por 24 h para converter os *N*-óxidos nas suas correspondentes bases livres e depois filtrado em papel de filtro com auxílio de vácuo. O papel de filtro foi lavado com HCl 2 N até completar um volume de filtrado de 500 mL. Em seguida, em um funil de separação, o filtrado foi particionado com hexano (5 x 100 mL) e depois com CH₂Cl₂ (5 x 100 mL). As frações em diclorometano e em hexano apresentaram resultado negativo após análise com o reagente de Dragendorff, indicando a ausência do alcaloide. A fração aquosa remanescente foi transferida para um erlenmayer e alcalinizada com aproximadamente 40 mL de NH₄OH concentrada até atingir valor de pH 10 e, em seguida, particionada sucessivamente com éter dietílico (20 x 100 mL), diclorometano (20 x 50 mL), acetato de etila (15 x 100 mL) e butanol (5 x 200 mL) fornecendo as frações em éter **FA1**, em diclorometano **FA2**, em acetato de etila **FA3** e em butanol **FA4**. A metodologia utilizada está descrita no fluxograma ilustrado na Figura 13. As frações obtidas foram analisadas qualitativamente por CCD segundo a metodologia descrita por WAGNER e BLADT (1996).

3.2.4 Análise de alcaloides no chá obtido de *E. hypertropicum*

Para o preparo do chá, foi utilizado 10,0 g de folhas de *E. hypertropicum* e aquecido com 1,0 L de água destilada durante 25 min (procedimento tradicional). Após este período, o decocto obtido foi filtrado em papel de filtro e o filtrado obtido foi deixado em repouso para atingir a temperatura de aproximadamente 20 °C. Em seguida, o extrato aquoso foi extraído com hexano (3 x 100 mL). A fração em hexano apresentou resultado negativo após análise com o reagente de Dragendorff, indicando a ausência do alcaloide. A fração aquosa foi transferida para um erlenmayer e alcalinizada com NH₄OH concentrada até atingir valor de pH 10 e em seguida particionada em funil de decantação com éter dietílico (4 x 100 mL) e acetato de etila (4 x 50 mL), obtendo-se assim a fração em éter (ECH) e em acetato de etila (AcCH) do chá de *E. hypertropicum*. As frações obtidas em éter e em acetato de etila foram secadas com sulfato de sódio anidro e depois filtradas. Os filtrados foram evaporados à secura em evaporador rotatório sob vácuo e os resíduos resultantes foram dissolvidos em 5 mL de MeOH e transferido para um frasco de vidro.

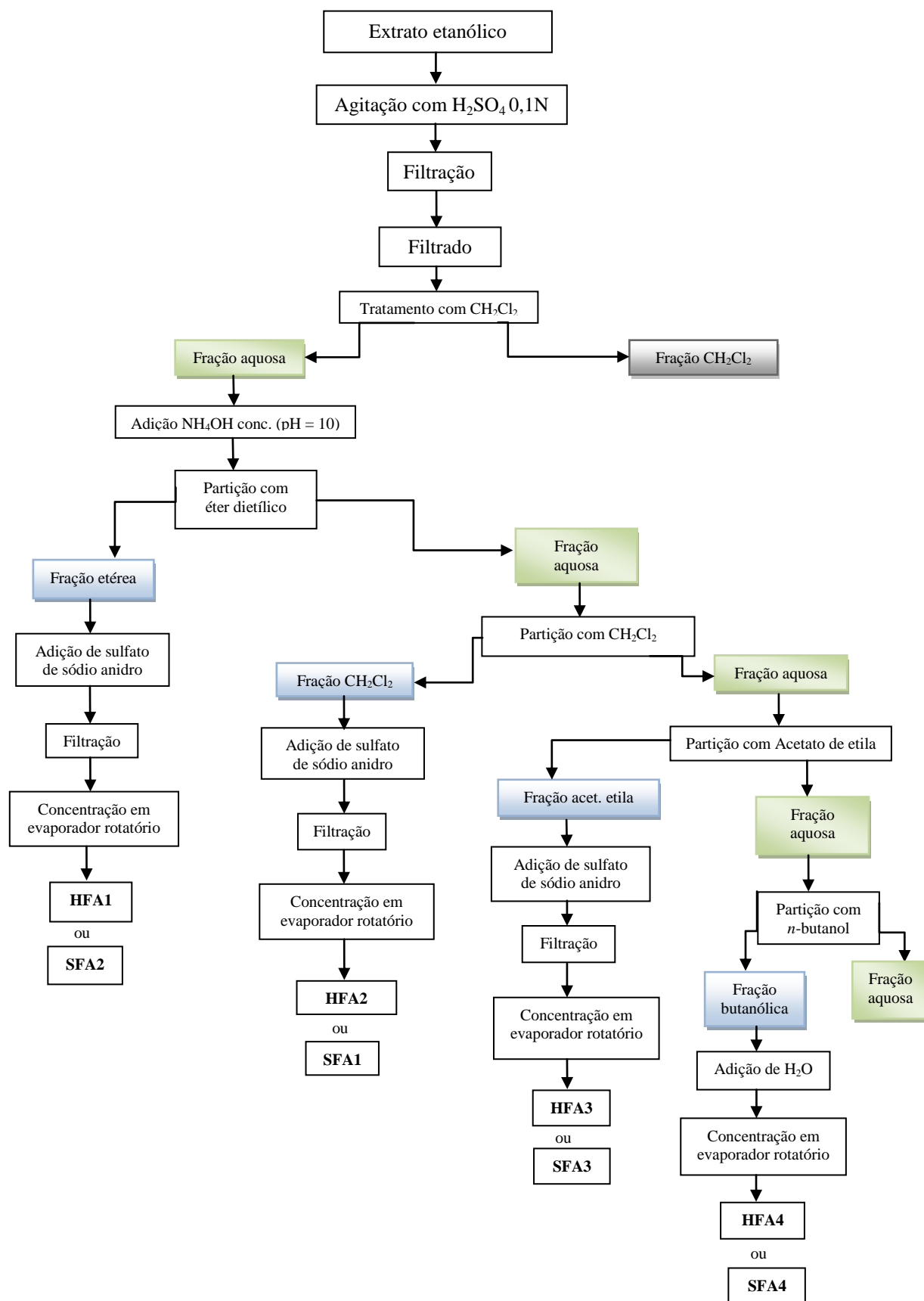


Figura 12. Fluxograma de obtenção das frações alcaloídicas (APs terciários).

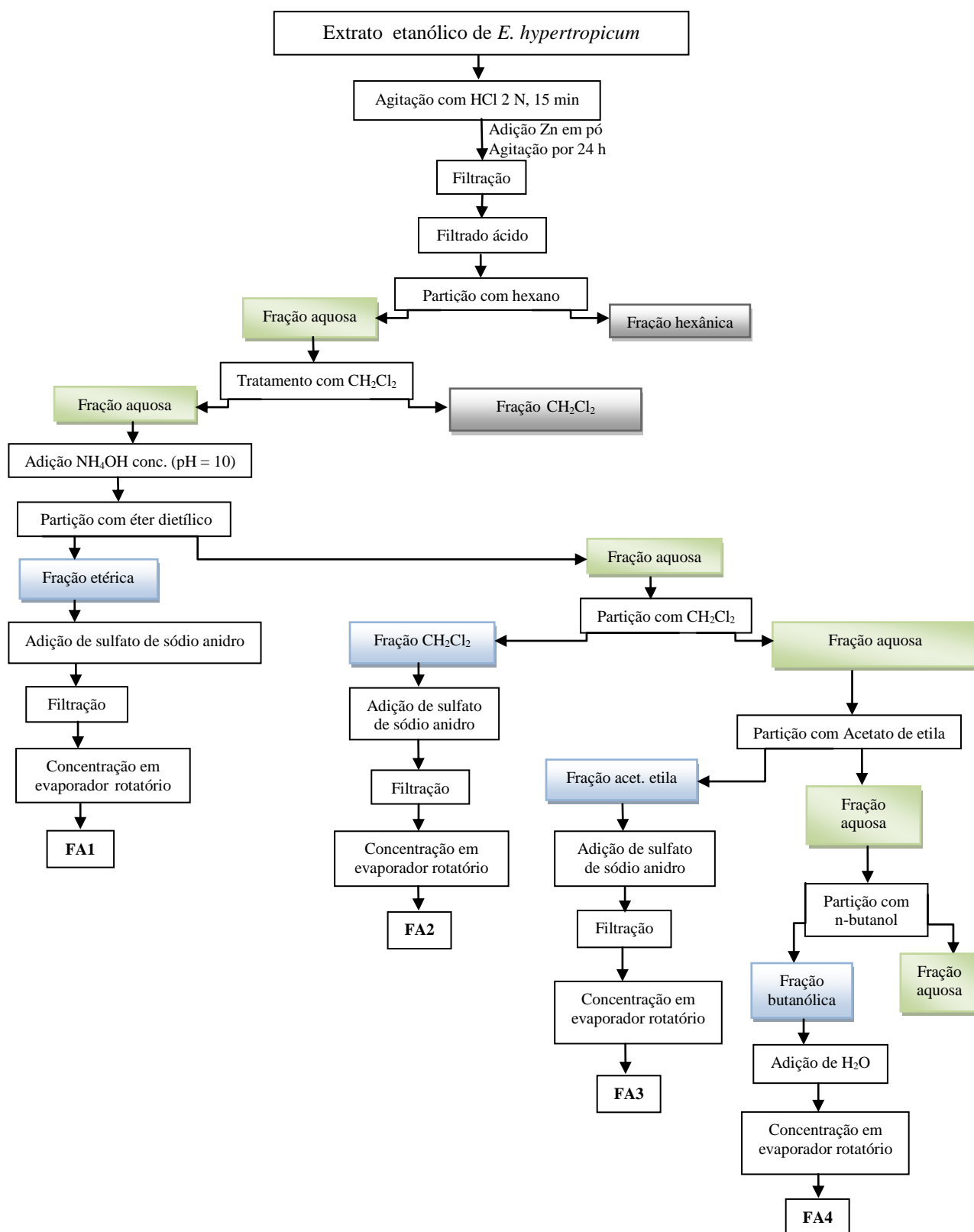


Figura 13: Fluxograma de obtenção das frações alcaloídicas (APs totais) de *E. hypertropicum*.

3.3 Extrações para *Echium stenosphon* subsp. *stenosphon*

3.3.1 Obtenção do extrato etanólico

As folhas de *Echium stenosphon* foram submetidas ao processo de secagem à sombra, em temperatura ambiente (25 °C) pelo período de aproximadamente 20 dias. Após a secagem, as folhas (5,5 kg) foram fragmentadas utilizando o moinho do tipo martelo e, em seguida, o material (5,4 kg) foi umedecido com etanol comercial (96 °GL) durante 4 horas. Em seguida, o material foi acondicionado camada por camada no percolador e 10,0 L de etanol comercial (96 °GL) foi adicionado cuidadosamente e deixado em repouso durante 24 h (Figura 14). Após, iniciou-se a percolação simples coletando cerca de 8 gotas/min do percolado para cada 100,0 g da folha moída até o esgotamento completo da droga vegetal. A solução etanólica obtida foi filtrada em papel de filtro e o filtrado foi concentrado em evaporador rotatório sob vácuo, obtendo assim o extrato etanólico.



Figura 14. Processo de extração por percolação. Fonte: próprio autor.

3.3.2 Extração ácido-base para obtenção das frações alcaloídicas

3.3.2.1 Alcalídes pirrolizidínicos terciários

O extrato etanólico de *Echium stenosphon* (56,0 g) foi agitado durante 15 min com 840 mL de H₂SO₄ 0,1N e filtrado em papel de filtro. O papel de filtro foi lavado com H₂SO₄ 0,1N até completar a obtenção do volume final de filtrado igual a 1,12 mL. Em seguida, o

filtrado foi extraído com diclorometano (3 x 100 mL) em um funil de separação. A fração em diclorometano apresentou resultado negativo após análise com o reagente de Dragendorff, indicando a ausência do alcaloide. A fração aquosa resultante foi transferida para um erlenmayer e alcalinizada com NH_4OH concentrada até atingir valor de pH 10 e, em seguida, particionada sucessivamente com diclorometano (5 x 250 mL), éter dietílico (3 x 150 mL), diclorometano (20 x 50 mL), acetato de etila (3 x 100 mL) e butanol (4 x 250 mL) fornecendo as frações em diclorometano **SFA1**, em éter **SFA2**, em acetato de etila **SFA3** e em butanol **SFA4**. A metodologia utilizada está descrita no fluxograma ilustrado na Figura 12. As frações obtidas foram analisadas qualitativamente por CCD segundo a metodologia descrita por WAGNER e BLADT (1996).

3.3.3 Análise de alcaloides no chá obtido de *Echium stenosiphon*

Para o preparo do chá, foi utilizado 10,0 g de folhas de *E. stenosiphon* e aquecido com 1,0 L de água destilada durante 25 min (procedimento tradicional). Após este período, o decocto obtido foi filtrado em papel de filtro e o filtrado obtido foi deixado em repouso para atingir a temperatura de aproximadamente 20 °C. Em seguida, o extrato aquoso resultante foi extraído com hexano (3 x 100 mL). A fração em hexano mostrou ser negativa quando revelada com reagente de Dragendorff indicando ausência de alcaloide. A fração aquosa foi posteriormente transferida para um erlenmayer e alcalinizada com NH_4OH concentrada até atingir valor de pH 10 e, em seguida, particionada em funil de decantação com éter dietílico (4 x 100 mL) e acetato de etila (4 x 50 mL), obtendo-se assim as frações etéria (ECS) e acetato de etila (AcCS) do chá de *E. hypertropicum*. As frações em éter e em acetato de etila foram secadas com sulfato de sódio anidro e depois filtradas. Os filtrados foram evaporados à secura em evaporador rotatório sob vácuo e os resíduos resultantes foram dissolvidos em 5 mL de MeOH e transferido para um frasco de vidro.

3.4 Análise das frações alcaloídicas por cromatografia em camada delgada (CCD)

Todas as frações alcaloídicas de ambas as espécies de *Echium* tiveram seus perfis cromatográficos determinados. Para tal, foi utilizado como fase estacionária placas de alumínio revestidas com gel de sílica. Na análise por CCD das frações em éter e em diclorometano, foi utilizado o seguinte sistema de eluente: tolueno/ acetato de etila/ dietilamina (70:20:10), em uma cuba cromatográfica. Para as frações em acetato de etila e em butanol, foram utilizados os seguintes sistemas de eluentes: acetato de etila/ tolueno/ dietilamina (70:20:10) e acetona/ acetato de etila/ dietilamina (6:3:1), respectivamente. Após a eluição dos solventes, as placas foram secas à temperatura ambiente e observadas sob a luz ultravioleta (254 nm e 365 nm) e, em seguida, reveladas com reativo de Dragendorff (iodobismutato de potássio aquo-acético). Outras placas de CCD foram preparadas nas mesmas condições e reveladas com o ácido sulfúrico 10% em EtOH para verificar a presença de outras classes de substâncias não alcaloídicas. As frações alcaloídicas em éter (HFA1 e SFA1) foram preparadas também nas mesmas condições e borrifadas com reativo de Mayer, onde o aparecimento de uma banda amarela foi indicativo da presença de alcaloides.

3.5 Teste de Mayer para detecção de alcaloides

O teste foi realizado utilizando as frações alcaloídicas em éter (HFA1 e SFA1) que foram resuspendidas em clorofórmio. Uma alíquota de 0,5 mL de cada amostra foi colocada no tubo de ensaio e em seguida foi gotejado o reativo de Mayer. O surgimento de turvação ou o aparecimento de um precipitado amarelo foi indicativo da presença de alcaloides (MATOS, 2009).

3.6 Isolamento dos metabólitos secundários

3.6.1 *Echium hypertropicum*

3.6.1.1 Alcaloides pirrolizidínicos terciários

A fração em éter HFA1 (60 mg) foi submetida a uma coluna de filtração em gel contendo o polímero Sephadex™ LH-20 (GE HEALTHCARE), no qual foi utilizado MeOH como solvente. Foram obtidas 44 frações que foram agrupadas de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico apresentado na análise por CCD, em 8 sub-frações (EH1a-EH8a). A sub-fração EH1a (40 mg) foi recromatografada em uma nova coluna Sephadex™ LH-20, fornecendo 30 frações que foram combinadas novamente em 4 sub-frações de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico em CCD. O grupo de frações 0-17 forneceu a substância **5**. A fase móvel utilizada na análise por CCD foi tolueno/acetato de etila/dietilamina (7:2:1) e Dragendorff e ácido sulfúrico 10% em EtOH foram utilizados como revelador colorimétrico.

3.6.1.2 Alcaloides pirrolizidínicos totais

A fração em éter FA1 (299,7 mg) foi cromatografada em coluna com Sephadex™ LH-20 (GE HEALTHCARE) utilizando como solvente metanol, fornecendo 93 frações que foram combinadas em 10 sub-frações (EH1-EH10) de acordo com a análise dos perfis cromatográficos por CCD. A sub-fração, EH3 (30-40; 80,0 mg) foi submetida a uma nova coluna com Sephadex™ LH-20 utilizando metanol como fase móvel, originando 56 novas frações que foram agrupadas em 5 sub-frações (EH3a-EH3e) de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico apresentado na análise por CCD. As subfrações EH3b e EH3c (24-48, 70,0 mg) foram submetidas a CCD em escala preparativa (Sílica gel 60G F₂₅₄) que permitiu o isolamento das substâncias **1** e **2**. As análises por CCD foram realizadas utilizando como fase móvel a mistura de tolueno/acetato de etila/dietilamina (7:2:1) e reveladas com reagente de Dragendorff e ácido sulfúrico 10% em EtOH.

3.6.1.3 Triterpeno

A porção insolúvel em H_2SO_4 0,1N do extrato etanólico (26,0 g) (item 3.2.3.1) foi resuspendido em EtOH 90% (100 mL) e particionado com hexano (5 x 100 mL) e CH_2Cl_2 (3 x 50 mL) obtendo assim as frações em hexano e em diclorometano, respectivamente.

A fração em hexano foi tratada com acetona e, a porção solúvel em acetona foi submetida em uma coluna filtrante (conectada ao vácuo) contendo gel de sílica 60 (partículas de 0,063-0,2 mm) como fase estacionária. Os solventes utilizados foram o hexano (3 x 100 mL) seguido de hexano/tolueno (1:1) (3 x 100 mL), tolueno (3 x 100 mL), tolueno/acetato de etila (1:1) e acetona (2 x 50 mL). A sub-fração solúvel em tolueno (1,1 g) foi cromatografada em uma coluna de Sílica 60, utilizando como eluente hexano/acetato de etila em diferentes proporções, até atingir 3% acetato de etila e posteriormente com hexano/acetona até atingir 3% de acetona, originando assim 13 frações (1-13), que foram agrupadas de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico apresentado na análise por CCD. A fração T1 (1-5; 99,6 mg) (hexano/acetato de etila 1%) foi recristalizada com hexano obtendo-se a substância **9**. As placas de CCD foram desenvolvidas, utilizando como eluente hexano/acetato de etila (8:2) como fase móvel e reveladas com vanilina sulfúrica e ácido sulfúrico 10% em EtOH.

3.6.2 *Echium stenosiphon* subsp. *stenosiphon*

3.6.2.1 Alcaloides pirrolizidínicos terciários

A fração em éter SFA1 (231,0 mg) foi cromatografada em coluna com SephadexTM LH-20, utilizando metanol como solvente, fornecendo 34 frações que foram combinadas em 9 subfrações (ESa-ESi) de acordo com a análise dos perfis cromatográficos por CCD. A Substância **6** foi isolada e purificada por uma nova coluna SephadexTM LH-20 das sub-frações ricas em alcaloides ESc (7-12, 145,0 mg) originando assim 34 frações que foram combinadas novamente em 8 subfrações de acordo com a análise do perfil cromatográfico em CCD (Figura 15). O sistema de eluente utilizado na análise por CCD foi tolueno/ acetato de etila/ dietilamina (7:2:1) e revelada com reagente de Dragendorff e ácido sulfúrico 10% em EtOH.

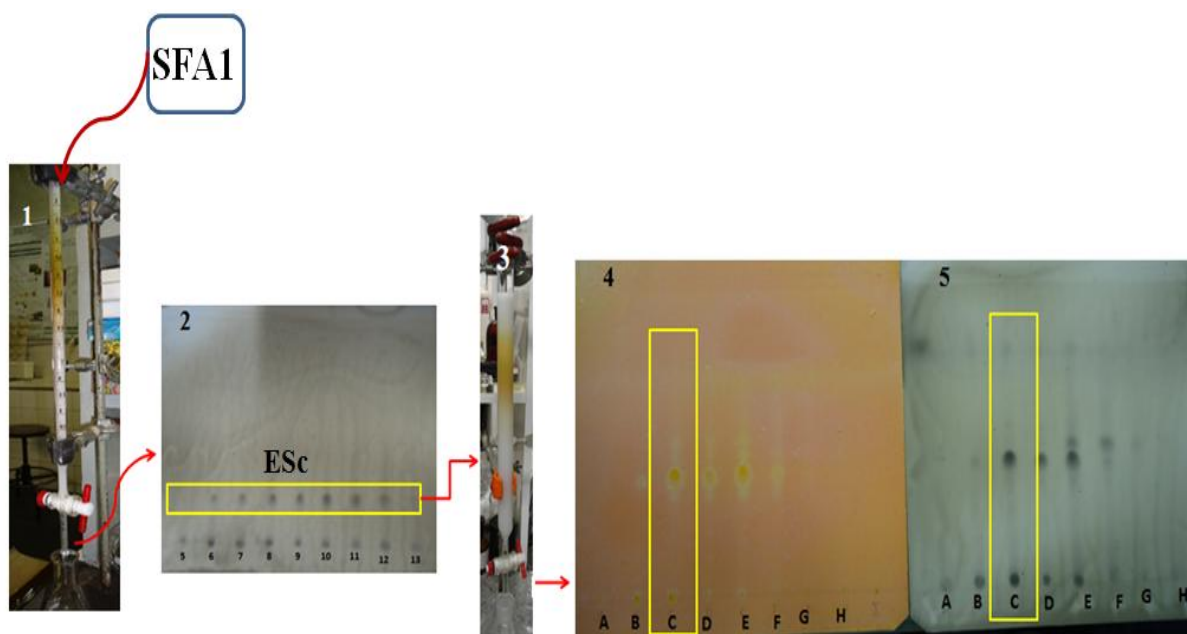


Figura 15: 1- Coluna com SephadexTM LH-20 da SFA1; 2- cromatograma com as frações semelhantes; 3- Coluna SephadexTM LH-20 das frações reunidas (ESc); 4 e 5 cromatograma das frações agrupadas da segunda coluna. Fase estacionária da CCD: gel de sílica; Fase móvel da CCD: tolueno/ acetato de etila/ dietilamina (70:20:10). Revelador: Dragendorff (4) e H₂SO₄ 10% em MeOH (2 e 5).

3.7 Determinação Estrutural

A elucidação estrutural das substâncias identificadas foi efetuada através da utilização de um conjunto de diferentes técnicas espectroscópicas que inclui RMN de ^1H e ^{13}C , unidimensional e bidimensional e espectrometria de massas.

3.7.1 Análises por RMN

Os espectros de RMN de 1D e 2D foram obtidos no espectrômetro Varian VNMRS. Os espectros dos alcaloides foram obtidos a 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C , enquanto que o espectro do triterpeno foi obtido a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C . Os valores de deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e o TMS foi utilizado como padrão interno. O clorofórmio deuterado foi obtido do Cambridge Isotope Laboratories (EUA) e utilizado para solubilizar as amostras. Os experimentos de RMN de 2D utilizados foram análises de correlação homonuclear (COSY) e heteronuclear (HSQC e HMBC). A edição dos espectros foi realizada utilizando-se os softwares SpinWorks 3.1.5.0 e MestReNova 6.0.2-5475.

3.7.2 Análises por ESI-EM/EM

Os espectros ESI-Q-TOF EM foram obtidos no modo positivo utilizando o aparelho QTOF Micro Mass Spectrometer (Waters, Manchester, U.K.), contendo um tubo de modo inteligente com voltagem capilar fixado em 3,5 kV, voltagem do cone em 30 V, temperatura da fonte em 100 °C e temperatura de dissolvatação em 120 °C. As amostras foram introduzidas por infusão de uma solução em MeOH.

3.7.3 Análises por CG-EM

As análises por CG-MS foram realizadas no cromatógrafo com fase gasosa CGEM-QP5000 (SHIMADZU) equipado com detector de massas, com ionização por impacto de elétrons e equipado com uma coluna RTX-5 (id = 0,25 mm, comprimento 30 m, espessura = 0,25 μm). As condições utilizadas na cromatografia com fase gasosa foram diferentes para o óleo essencial, as frações alcaloídicas e as substâncias isoladas, conforme descritas a seguir.

As condições do espectrômetro de massas foram idênticas para todas as amostras, no qual foi utilizado a energia de ionização de 70 eV e taxa de varredura igual a 1 scan/s. Os padrões de fragmentação de massa obtidos foram comparados com os espectros de massa armazenados na biblioteca NIST (National Institute of Standards and Technology) do equipamento.

A análise do óleo essencial foi realizada utilizando a temperatura de injeção: 200 °C; temperatura FID: 290 °C; gás de arraste: hélio; fluxo: 0,8 mL/min; injeção: 1 µl da amostra no modo split (razão do split: 1:10). A temperatura inicial do forno foi de 40 °C com aumento a uma taxa de 3 °C/min até 110 °C e após 2 °C/min até 280 °C. O óleo foi dissolvido em diclorometano e em seguida injetado na RTX-5. A composição percentual do óleo foi calculada pelo método de normalização das áreas dos sinais dos cromatogramas obtidos após análise por cromatografia com fase gasosa. A identificação das substâncias foi realizada por comparação do índice aritmético (AI), determinado em relação ao tempo de retenção de uma série de n-alcenos (C7-C26), com dados de referência correspondentes (ADAMS, 1995; BOATRIGT e CRUM, 1997; BEAULIEU e GRIMM, 2001; ZEHENTBAUER e REINECCIUS, 2002; GHASSEMI *et al.*, 2003; KARIOTI *et al.*, 2003; SKALTSA *et al.*, 2003; ADAMS, 2007).

As análises das frações alcaloídicas e as substâncias isoladas foram realizadas com as seguintes condições do cromatógrafo com fase gasosa (CG): temperatura do injetor: 250 °C; temperatura do FID: 250 °C; gás de arraste: Hélio; fluxo: 1 mL/min; cerca de 1 µl das amostras foram injetadas no modo split (razão do split: 1:10). A temperatura programada foi de 150 – 300 °C a 6 °C/min.

A análise do triterpeno foi realizada utilizando as seguintes condições para cromatógrafo com fase gasosa: temperatura do injetor: 290 °C; temperatura do FID: 290 °C; gás de arraste: Hélio; fluxo: 1 mL/min; cerca de 1 µl das amostras foram injetadas no modo split (razão do split: 1:10). As temperaturas programadas foram de 60 – 290 °C. Nos primeiros 3 min a temperatura foi mantida em 60 °C e, após este período, houve um aumento de 10 °C/min até 290 °C e mantida até 61 min.

3.8 Atividades biológicas

3.8.1 Atividade antibacteriana

O teste de atividade antibacteriana foi realizado em parceria com o Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia da Faculdade de Farmácia da UFF – RJ.

Microorganismo

Foram utilizados cepas de referência da American Type Culture Collection (ATCC) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Padrão utilizado para o ensaio microbiológico e meios de cultura

Para controle positivo do teste de susceptibilidade foi utilizado disco de vancomicina (Sensibiodisc – Cecon, de 30 µg).

Os meios de cultura utilizados para o ensaio antimicrobiano foram o Agar Mueller-Hinton (Difco) e o Caldo de Mueller-Hinton (Vetec).

Preparação de suspensão bacteriana

As bactérias utilizadas para o inóculo foram ajustadas de acordo com a escala de 0,5 Mac Farland, a qual equivale a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ - 10^7 unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro.

Teste de susceptibilidade – Concentração Mínima Inibitória (CMI)

O teste utilizado foi o de microdiluição em caldo e realizado de acordo com as recomendações do CLSI (2008). Em uma microplaca esterilizada de 96 orifícios, foram depositados 100 µL de caldo Muller Hinton em cada poço. No primeiro poço da primeira coluna foram acrescentados 100 µL da amostra diluída em DMSO de concentração conhecida. A partir deste orifício, diluições sucessivas foram feitas, rejeitando-se no final 100 µL da mistura. Em seguida, 100 µL de uma suspensão bacteriana diluída para concentração final de 10^5 UFC/mL foram acrescentadas a cada poço, obtendo assim as amostras nas concentrações de 500; 250; 125; 62,5 e 31,2 µg/mL para os extratos etanólicos e 50; 25; 12,5;

6,2 e 3,1 µg/mL para o alcaloide **6**. As placas foram incubadas por 24 h à 37 °C. Após o período de incubação, foram acrescentados 50 µL de uma solução aquosa de TTC (cloreto de trifetil tetrazolium) a 2,5%, e, a placa incubada novamente por 3 horas na referida temperatura. O aparecimento de uma coloração vermelha significa crescimento bacteriano. A CMI foi definida como a menor concentração da amostra capaz de impedir o crescimento bacteriano e, portanto o aparecimento da coloração vermelha detectável ao olho nu. O controle do experimento foi feito com meio de cultura inoculado com bactéria e solução salina; meio de cultura adicionado de vancomicina e bactéria e, finalmente, meio de cultura inoculado com bactéria e DMSO (FRANÇA, 2010).

3.8.2 Atividade anticolinesterásica - método quantitativo

O teste foi realizado em colaboração com o laboratório do Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário Antônio Pedro da UFF. Para quantificar a atividade da enzima acetilcolinesterase, foi realizado o ensaio espectrofotométrico baseado no método colorimétrico de Ellman descrito por RHEE e colaboradores (2001) com adaptações, utilizando uma microplaca de 96 poços. Um volume total de 200 µL de meio de ensaio composto por 65 µL de tampão de fosfato salino (PBS), 60 µL de 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) 1,5 mM, 25 µL de acetilcolinesterase de peixe elétrico (Sigma) (AChE) 0,2 U/mL, 25 µL da amostra e 25 µL de iodeto de acetiltiocolina (ASCH) (Figura 16) foram utilizados. Diferentes concentrações das amostras (extratos etanólicos das duas espécies de *Echium*; a equimidina e 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina) além do controle positivo (eserina), foram dissolvidos em metanol e testados para uma curva de dose-resposta e de controle positivo. O controle negativo, usado para calcular a percentagem de inibição, foi medido utilizando amostra de metanol, sem o inibidor. A hidrólise espontânea de substrato foi calculada substituindo a solução de enzima por PBS, com a amostra de metanol. A absorvância foi medida cineticamente 17 vezes em 13 minutos a 412 nm.

A atividade enzimática é determinada pela velocidade da reação. Uma unidade (U) de atividade é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 µmol do produto. Neste caso, está relacionada com a taxa de formação da tiocolina.

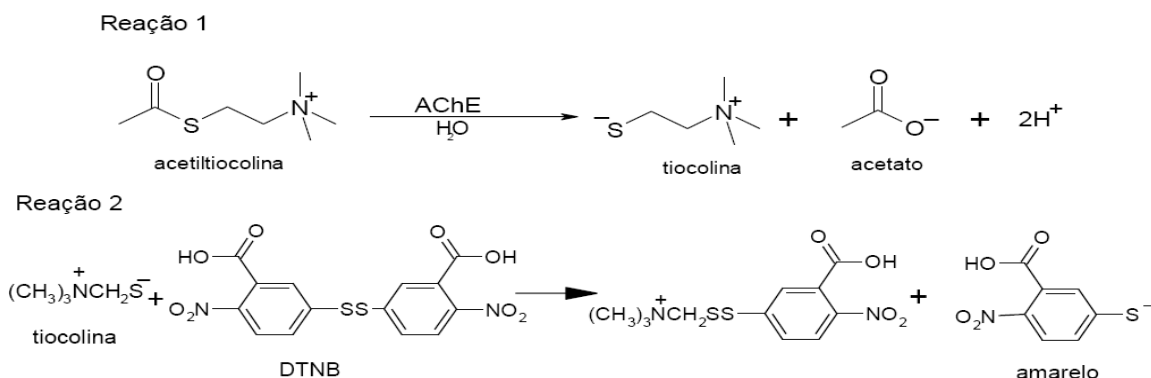


Figura 16. Reação colorimétrica de formação do ácido tionitrobenzóico.

3.8.3 Atividade inseticida

Os ensaios para avaliação de atividade inseticida foram realizados em colaboração com a Prof.^a Denise Feder do Laboratório de Biologia de Insetos do GBG/UFF. Foram utilizados os insetos *Dysdercus peruvianus* (Figura 17), espécies de percevejos e os barbeiros *Rhodnius prolixus* (Figura 18). A amostra foi testada na concentração de 1mg/mL, previamente diluída em DMSO/H₂O (10/90). Para o *Dysdercus peruvianus*, os testes foram realizados através de tratamento tópico, conforme descrito por FERNANDES e colaboradores (2012). As ninfas do 4º estágio foram separadas em grupos de 10 indivíduos e após aplicação da amostra, foram colocadas em frascos pequenos de aproximadamente 7 cm de profundidade por 5 cm de diâmetro. Em seguida, se iniciou a contagem diária, acompanhando o desenvolvimento dos insetos até atingirem o estágio adulto, o que levou em média 30 dias. O controle negativo foi efetuado com aplicação de 1µL de DMSO no dorso dos insetos, submetidos às mesmas condições do grupo experimental.

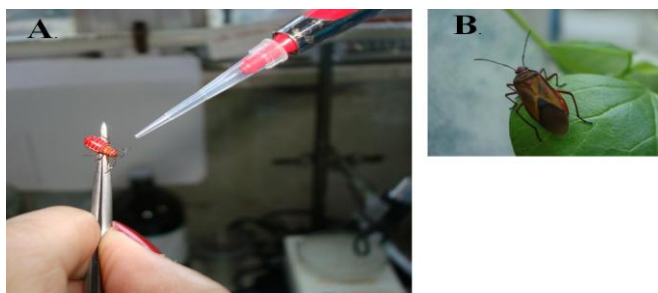


Figura 17. A- *D. peruvianus* no quarto estágio durante o processo de aplicação da droga (Fonte: GBG/UFF); B – adulto de *D. peruvianus* (Fonte: Saullo Rigon).

No caso do *Rhodnius prolixus* (Figura 18), foram utilizados adultos e ninfas de 5º estágio, seguindo a metodologia descrita por MELLO e colaboradores (2007 e 2008). Os insetos do grupo controle positivo receberam igual quantidade de DMSO. Os insetos do grupo controle negativo não sofreram qualquer espécie de tratamento ou manipulação. Foram avaliados os seguintes parâmetros: atividade sobre o ciclo de vida, morte em 24 horas, e mortalidade total através da aplicação tópica de 1µl da amostra do alcaloide. O teste também levou em média 30 dias.

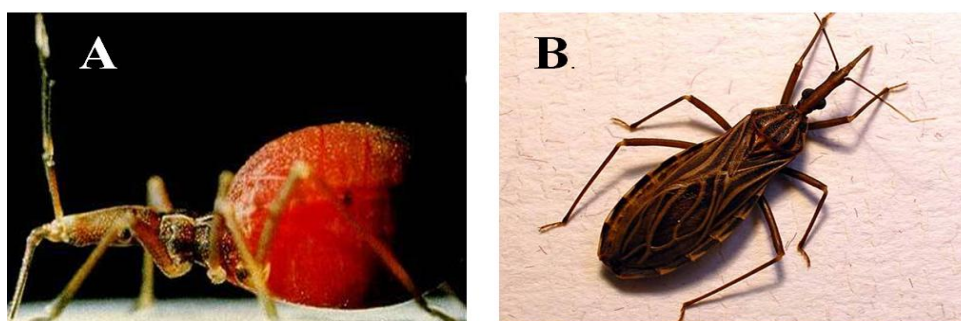


Figura 18. A- ninfa do 5º estágio de *Rhodnius prolixus*; B – Adulto de *Rhodnius prolixus* (Fonte: <http://marcosfelliipe.blogspot.com.br/2011/10/protozoario-causador-da-doenca-de.html> acessado em 05/11/2012).

3.8.4 Atividade antiviral

Os ensaios para avaliação de atividade antiviral frente aos vírus *Herpes simplex* tipos 1 e 2 foram realizados em colaboração com Prof^a. Dr.^a Maria Teresa Villela Romanos do Laboratório Experimental de Drogas Antivirais e Citotóxicas (LEDAC), do Departamento de Virologia do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, da UFRJ, segundo a metodologia descrita por FALCÃO (2007).

Atividade Inibitória sobre os vírus *Herpes simplex* tipos 1 e 2

Células e Vírus

As células Vero (fibroblasto de rim de macaco *Cercopitheccus aethiops*) usadas como sistema hospedeiro foram crescidas em meio mínimo essencial de Eagle (MEM)

suplementado com 2 mM de L-glutamina, 50 µg/mL de garamicina, 2,5 µg/mL de fungizona, solução de bicarbonato de sódio a 0,25%, HEPES 10mM e 10% de soro fetal bovino (SFB) e sem SFB (meio de manutenção). As culturas de células foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂.

As amostras de HSV-1 e HSV-2 resistentes ao aciclovir, isoladas a partir do fluido de vesículas características de herpes labial e genital, respectivamente, pertencem à coleção do LEDAC (Laboratório Experimental de Drogas Antivirais e Citotóxicas) do Departamento de Virologia do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da UFRJ.

Titulação do vírus

A titulação viral foi realizada para se estabelecer a TCID₅₀ (concentração capaz de produzir o efeito citopático em 50% das culturas de células), de acordo com o cálculo estabelecido por REED & MÜENCH (1938). Foram realizadas diluições logarítmicas decimais (10^{-1} - 10^{-7}) das suspensões virais, utilizando-se o meio de manutenção celular (MEM sem SFB) como diluente. Cada diluição foi inoculada em monocamadas de células confluentes (microplaca com 96 poços) após a substituição do meio de crescimento pelo de manutenção. As células inoculadas foram incubadas a 37 °C por 48 horas.

Preparo das amostras

Foram testados os extratos etanólicos bruto das folhas de *E. hypertropicum* (EH) e *E. stenosphon* subsp. *stenosphon* (ES). Os extratos foram pesados em balança analítica, solubilizados em DMSO, ressuspensos em água destilada para obter a concentração de 400 µg/mL, filtrados em membrana millipore (0,22 µm) e conservados à temperatura de -20 °C ao abrigo da luz.

Avaliação da toxicidade dos extratos etanólicos de *E. hypertropicum* e *E. stenosphon* subsp. *stenosphon*

Para a avaliação da atividade antiviral de uma substância, é necessária a determinação da sua toxicidade para os sistemas hospedeiros empregados. A citotoxicidade pode ser determinada baseando-se na alteração morfológica e na viabilidade celular (DE CLERCQ *et al.*, 1980).

Observação da alteração morfológica celular

Os extratos das duas espécies de *Echium* foram submetidos a diluições seriadas, a partir de 200 µg/mL, com fator de diluição de 2, utilizando-se MEM sem SFB como diluente, e colocados em contato com as monocamadas de células confluentes. A seguir, as células foram incubadas a 37 °C por 48 h, sendo examinadas diariamente ao microscópio óptico invertido e comparadas com o controle. O efeito citotóxico foi detectado pelo aparecimento de células redondas, vacúolos e/ou descolamento da monocamada da superfície suporte (RODRIGUEZ *et al.*, 1990). A maior concentração da substância em que não houve efeito citotóxico, foi denominada de concentração máxima não tóxica (CMNT) e utilizada nos estudos antivirais.

Verificação da viabilidade celular

A citotoxicidade foi determinada através da técnica *dye-uptake* (NEYNDORFF *et al.*, 1990) com pequenas modificações. A técnica consiste na incorporação do corante vermelho neutro pelas células vivas e sua posterior quantificação por leitura em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 492nm. A percentagem de células viáveis foi calculada pela fórmula:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\left[(\text{densidade óptica da droga}) - (\text{densidade óptica do controle}) \right]}{\left[(\text{densidade óptica do vermelho neutro}) - (\text{densidade óptica do controle}) \right]} \times 100$$

Então, é possível calcular a concentração citotóxica para 50% das células em cultura (CC₅₀), através de um gráfico. Não foram determinadas as concentrações efetiva 50% (CE₅₀) nesse experimento.

Avaliação da atividade antiviral

As suspensões virais foram diluídas na proporção 10^{-1} , 10^{-2} até 10^{-7} sendo inoculados 10 μ L de cada diluição em microplacas com cultura de células (6 poços/diluição) na presença da amostra a ser testada e meio de cultura, usado como controle. Inicialmente foi realizada uma triagem da atividade antiviral dos extratos utilizando-se a concentração máxima não tóxica (CMNT) previamente determinada.

Depois de inoculadas, as células foram incubadas por 48 horas a 37°C em ambiente com 5% de CO₂. Ao final desse período as células foram observadas em microscópio óptico invertido buscando-se identificar o efeito citopático (CPE) e os títulos dos vírus foram determinados, com base no método estatístico de REED & MÜENCH (1938). O grau de atividade antiviral foi expresso em percentagem de inibição (PI) e calculado empregando a fórmula proposta por NISHIMURA e colaboradores (1977):

$$PI = [1 - (\text{antilog } T / \text{antilog } C)] \times 100$$

Onde T representa as unidades infecciosas na cultura de células tratadas com a substância e C as unidades infecciosas na cultura de células não tratadas (controle).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Rendimento dos extratos etanólicos

O peso do extrato etanólico obtido da *Echium hypertropicum* foi de 248,0 g (4,47 % p/p da folha seca), enquanto que para *Echium stenosiphon* foi de 176,0 g (3,20 % p/p da folha seca).

4.2 Composição química do óleo essencial das flores da *Echium hypertropicum*

O óleo essencial das flores de *E. hypertropicum* apresentou-se com cor amarelo claro e odor forte. A quantidade do óleo essencial obtido após hidrodestilação das flores foi menor que 0,05 mL e, portanto, foi recolhido com auxílio de diclorometano. Um total de 32 componentes foram detectados e 22 substâncias foram caracterizadas, representando 79,37 % dos componentes voláteis presentes no óleo essencial. Os constituintes químicos e as percentagens relativas estão descritos na Tabela 3, conforme a ordem de eluição na coluna cromatográfica RTX-5. Os componentes majoritários foram o *trans*-fitol (30,65 %), o *n*-pentacosano (8,28 %) e *n*-tricosano (6,37 %). Os hidrocarbonetos oxigenados foram os mais representativos (56,51 %) do total dos componentes químicos identificados. O óleo essencial das flores também apresentou uma composição química rica em hidrocarbonetos alifáticos (23,13 %), conforme previamente descrito na literatura para este gênero, através da espécie *Echium amoenum* Fisch. & C.A. Mey (GHASSEMI *et al.*, 2003). Este é o primeiro estudo, até o presente, sobre a caracterização química do óleo essencial das flores de *Echium hypertropicum*.

Tabela 3. Composição química do óleo essencial das flores de *Echium hypertropicum*.

N ^o	IR	Constituintes	Per. relat.	Lit. IR
1	--	^a Não identificado	0.16	
2	843	^b Não identificado	1.67	
3	850	3Z - hexenol	0.33	ADAMS, 2007
4	999	Octanal	1.42	ZEHENTBAUER & REINECCIUS, 2006
5	1032	^c Não identificado	0.39	
6	1098	Nonanal	2.22	ADAMS, 1995
7	1201	n-decanal	1.47	ADAMS, 2007
8	1300	n-tridecano	4.11	ADAMS, 2007
9	1305	Undecanal	1.06	ADAMS, 2007
10	1408	Dodecanal	0.83	ADAMS, 2007
11	1500	n-pentadecano	1.26	ADAMS, 2007
12	1501	^d Não identificado	0.90	
13	1611	Tetradecanal	1.59	ADAMS, 2007
14	1613	^e Não identificado	4.21	
15	1635	^f Não identificado	3.82	
16	1700	n-heptadecano	0.81	ADAMS, 2007
17	1702	^g Não identificado	1.50	
18	1818	Octadecanal	1.94	BEAULIEU & GRIMM, 2008
19	1845	6,10,14-trimetilpentadecan-2-ona	1.74	KARIOTI <i>et al.</i> , 2003
20	1921	Metil hexadecanoato	2.72	ADAMS, 2007
21	2077	n-octadecanol	0.93	ADAMS, 2007
22	2080	^h Não identificado	2.04	
23	2095	Metil linoleato	1.18	ADAMS, 2007
24	2087	(E)-Metil 9-octadecenoato	6.89	BOATRIGHT & CRUM, 1997
25	2114	Trans fitol	30.64	SKALTSA <i>et al.</i> , 2003
26	2124	Metil octadecanoato	1.54	ADAMS, 2007
27	2200	n-docosano	0.89	ADAMS, 2007
28	2300	n-tricosano	6.73	ADAMS, 2007
29	2400	n-tetracosano	1.05	ADAMS, 2007
30	2500	n-pentacosano	8.28	ADAMS, 2007
31	2535	ⁱ Não identificado	4.02	
32	---	^j Não identificado	1.93	
Hidrocarbonetos alifáticos			23,13	
Hidrocarbonetos oxigenados			56,51	
Total identificado			79.37	

^aEM *m/z* (int. relat.): 41,43, 44(100), 57, 58, 71, 86.^bEM *m/z* (int. relat.): 40, 41, 45(100), 56, 71, 88, 101, 116, 207.^cEM *m/z* (int. relat.): 40, 41, 55(100), 61, 70, 88, 99, 114, 132, 207.^dEM *m/z* (int. relat.): 40, 41, 43, 57, 82(100), 96, 110, 124, 126, 152, 168.^eEM *m/z* (int. relat.): 40, 41, 55, 79, 85, 107, 113, 127, 142, 155, 169(100), 183, 197, 212.^fEM *m/z* (int. relat.): 40, 41, 55, 67, 79, 85, 107, 113, 127, 142, 155, 169(100), 195, 212.^gEM *m/z* (int. relat.): 40, 41, 43, 57, 82, 135(100), 149, 154, 180, 191, 208, 220.^hEM *m/z* (int. relat.): 41, 55, 82, 94, 98, 124(100), 129, 142, 158, 168, 182, 201, 214, 228, 238, 256, 271.ⁱEM *m/z* (int. relat.): 40, 57, 71, 84, 104, 113, 132, 149(100), 167, 168, 221, 261, 279, 280, 355, 391.^jEM *m/z* (int. relat.): 41, 43, 57(100), 71, 85, 99, 113, 127, 155, 169, 197, 211, 225, 253, 281, 295, 323.

4.3 Rendimento das frações alcaloídicas

O rendimento das frações alcaloídicas a partir dos extratos etanólicos estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Rendimento das frações alcaloídicas de *E. hypertropicum* e *E. stenosiphon*.

<i>E. hypertropicum</i>		<i>E. stenosiphon</i>
APs terciários	APs totais	APs terciários
HFA1 (60,0 mg; 0,13 %)	FA1 (299, 7 mg; 0,15 %)	SFA2 (74,3 mg; 0,13 %)
HFA2 (38,3 mg; 0,09 %)	FA2 (236, 1 mg; 0,12 %)	SFA1 (231,0 mg; 0,41 %)
HFA3 (0,0 %)	FA3 (674, 2 mg; 0,33 %)	SFA3 (0,0 %)
HFA4 (2,1 g; 4, 66 %)	FA4 (4,20 g; 2,07 %)	SFA4 (2,51 g; 4,48 %)

A espécie *E. hypertropicum* apresentou maior rendimento das frações alcaloídicas obtidas através do método que utiliza o Zinco (APs totais) em relação ao método sem o Zinco, principalmente nas frações em éter (FA1), em diclorometano (FA2) e em acetato de etila (FA3). Este maior rendimento obtido através do método com o uso do Zn pode estar relacionado às maiores quantidades utilizadas de extrato etanólico e solvente, além da redução efetiva pelo Zn dos *N*-óxidos para sua correspondente base livre, uma vez que os *N*-óxidos são raras vezes extraídos por uma reação ácido-base convencional.

O uso do Zn proporcionou não somente a obtenção de um maior rendimento para as frações alcaloídicas, mas, também a redução dos *N*-óxidos que pode estar correlacionado com a presença de outros alcaloides detectados na fração em acetato de etila (FA3), através da presença de bandas com coloração característica de alcaloides na placa de CCD após a revelação com Dragendorff, que não foram observadas na fração em acetato de etila obtida através do método sem adição de Zn para ambas as espécies de *Echium*.

4.4 Identificação qualitativa dos alcaloides presentes nas frações alcaloídicas

A placa de CCD das frações etéricas de *E. hypertropicum* e *E. stenosiphon* sem adição do Zn apresentaram bandas com cor laranja a amarela, após a revelação com os reagentes Dragendorff e Mayer, indicando a presença de alcaloides, conforme ilustrado em A e B na Figura 19. Além disso, as frações etéricas de *E. hypertropicum* e *E. stenosiphon* apresentaram turvação, seguido de precipitado amarelo, após a adição do reagente de Mayer como ilustrados em C e D na Figura 19.

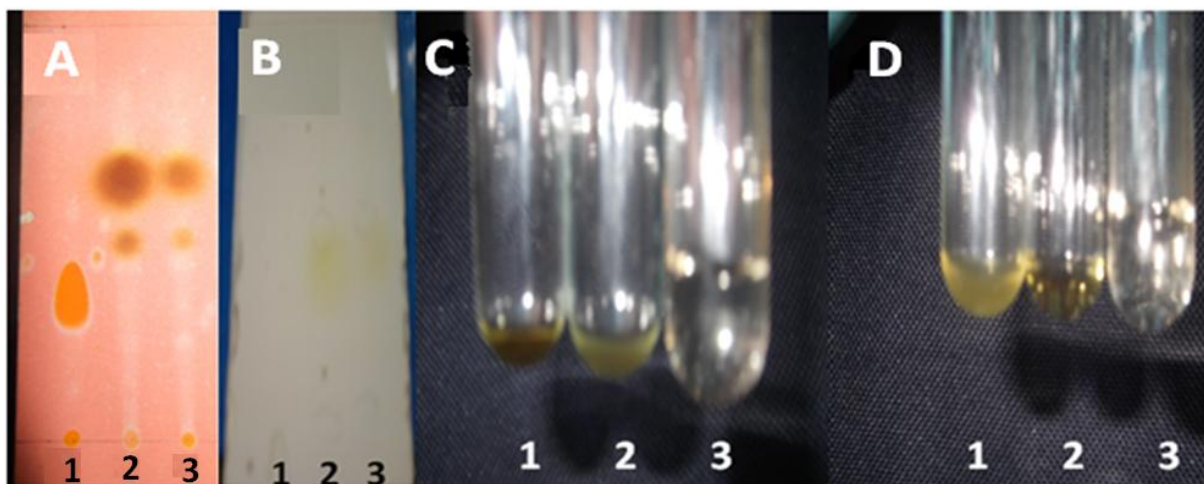


Figura 19. A e B- cromatograma das frações revelados com reagente de Dragendorff (A) e reagente de Mayer (B): 1- atropina, 2 – fração em éter da *E. hypertropicum*, 3 - fração etérica da *E. stenosiphon*, sistema de eluente: tolueno/ acetato de etila/ dietilamina (70:20:10); C- precipitação com reagente de Mayer: 1- fração em éter da *E. hypertropicum*, 2 - fração em éter da *E. hypertropicum* + reagente de Mayer, 3- Reagente de Mayer; D - precipitação com reagente de Mayer: 1- fração em éter de *E. stenosiphon* + reagente de Mayer, 2 - fração em éter da *E. stenosiphon*, 3- Reagente de Mayer.

4.5 Identificação de alcaloides nos chás de *E. hypertropicum* e *E. stenosiphon*

A CCD das frações em éter e em acetato de etila dos chás de *E. Hypertropicum* e *E. stenosiphon* apresentaram resultados positivos na análise por CCD para alcaloides após a revelação com reagente de Dragendorff (Figura 20), indicando a presença de alcaloides nos chás obtidas por decocção. Estudos mais aprofundados serão necessários para identificar o tipo de alcaloide, uma vez que APs são considerados tóxicos e foram identificados nas duas espécies de *Echium* estudadas.



Figura 20: Cromatograma das frações alcalóidicas: P- padrão de APs (uma das frações da coluna Sephadex™ LH-20 da fração em éter de *E. hypertropicum*); ECH- fração em éter de *E. hypertropicum*; ECS- fração em éter de *E. stenosiphon*; AcCH- fração em acetato de etila de *E. hypertropicum*; AcCS- fração em acetato de etila de *E. stenosiphon*. Sistema de eluente: tolueno/ acetato de etila/ dietilamina (70:20:10). Fase estacionária: gel de sílica.

4.6 Perfil cromatográfico das frações alcalóidicas de *E. hypertropicum* por CCD

A metodologia de extração que utilizou o Zn em pó permitiu a obtenção de frações ricas em alcaloides, denominadas de FA1, FA2, FA3 e FA4 que foram submetidas à análise cromatográfica na placa de CCD, na qual foi possível observar diferentes bandas de diferentes R_f , sugerindo assim a presença de alcaloides de diferentes polaridades, conforme ilustrado na Figura 21.

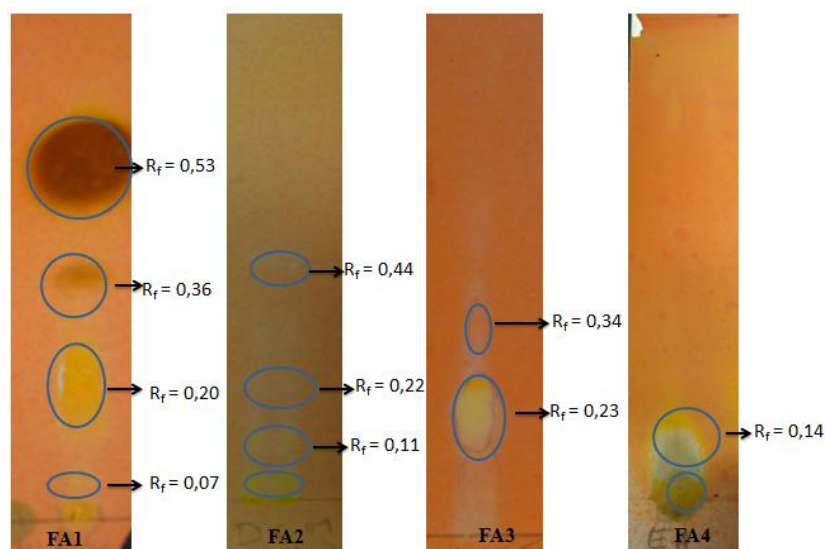


Figura 21. Cromatograma das frações: FA1- fração em éter; FA2- fração em diclorometano; FA3- fração em acetato de etila; FA4- fração em butanol. Sistema de eluente: tolueno/ acetato de etila/ dietilamina (70:20:10) para FA1 e FA2; acetato de etila/ tolueno/ dietilamina (70:20:10) para FA3 e acetona/ acetato de etila/ dietilamina (6:3:1) para FA4. Fase estacionária: gel de sílica. Revelador: Dragendorff.

A presença de diferentes bandas com coloração amarela, típica de alcaloide após a revelação com Dragendorff, sugere a redução efetiva dos *N*-óxidos, promovida pelo Zn, em suas correspondentes bases livres. Portanto, foi observada a presença de cinco bandas para a fração em éter FA1, que não foram observadas na fração em éter obtida sem o uso do Zn conforme ilustrado na Figura 19-A. Além disso, a fração em acetato de etila apresentou bandas características de alcaloides na análise por CCD que não estavam presentes na fração em acetato de etila obtida sem o uso do Zn.

4.7 Elucidação estrutural dos metabólitos

4.7.1 Alcaloides de *Echium hypertropicum*

4.7.1.1 Alcaloides pirrolizidínicos terciários

A análise da fração em éter (HFA1) por CG-EM forneceu o cromatograma com vários sinais (Figura 22), cujos espectros de massas dos sinais 1 a 7 apresentaram padrões de fragmentação típicos de alcaloides pirrolizidínicos que foram confirmados pela biblioteca NIST. No entanto, os íons moleculares não foram detectados, fato comumente observado com o uso de ionização por impacto eletrônico, que promove a fragmentação excessiva de algumas moléculas. Desta forma, faz com que o tempo de vida do íon molecular seja muito curto para ser detectado pelo analisador de massa (PAVIA *et al.*, 2012).

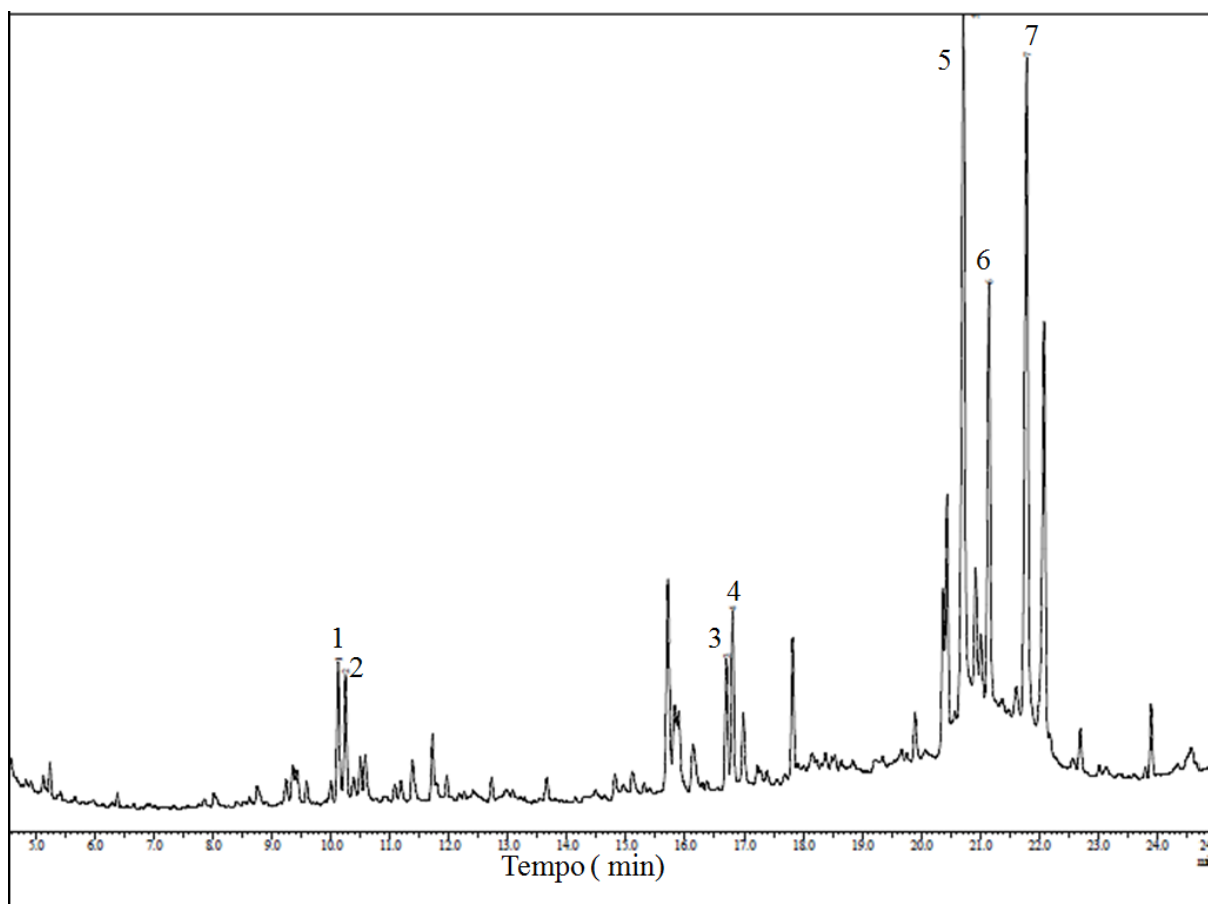


Figura 22. Cromatograma da fração HFA1 de *Echium hypertropicum* obtido por CG-EM.

Substância 1

O sinal **1** obtido no cromatograma (Figura 22) apresentou o espectro de massas com uma série de íons de m/z 137, 124, 111, 106, 94 e m/z 80, ilustrado na Figura 23 e descritos na tabela 6, típicos de APs monoéster 1,2-insaturados, esterificados no C-7 (WITTE *et al.*, 1993; EL-SHAZLY *et al.*, 1996b). O íon de m/z 138 é proveniente da fragmentação do éster através do mecanismo conhecido como segmentação α , que envolve a perda do grupo alcóxi para formar o íon acílio correspondente (íon de m/z 83) que é típico de fragmentação de éster, seguido de uma segmentação α adjacente ao grupo hidroxila (PAVIA, 2012). O íon de m/z 137 teve sua fragmentação proposta a partir da perda de uma molécula de água da substância precursora por um mecanismo de rearranjo, formando primeiramente o íon de m/z 219, seguido de uma segmentação α em C-10. O íon de m/z 136 originou a partir do íon em m/z 219 por uma cisão heterolítica entre a carbonila e o oxigênio do éster, enquanto que o íon de m/z 124 teve como precursor o íon de m/z 138 e originou por uma cisão heterolítica entre o carbono C-1 e C-9. A formação sugerida dos íons m/z 138, 137, 136, 83 e m/z 80 característicos de alcaloides pirrolizidínicos encontram-se ilustradas na Figura 24 (PAIVA, 2002; IBRAHIM, 2007; LIU *et al.*, 2009). Com base nos dados de fragmentação de massas relatados anteriormente (EL-SHAZLY *et al.*, 1996b), a substância **1** foi identificada como sendo 7-seneciailretronecina (Figura 25). Esta substância possui como pico base o íon fragmento de m/z 80 que o diferencia do seu isômero angeloil.

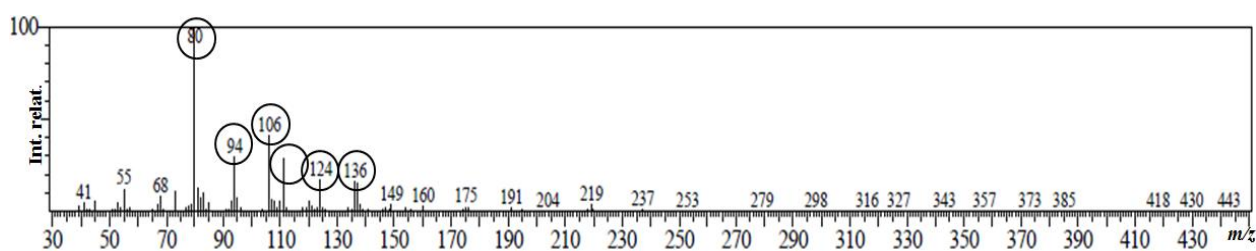


Figura 23. Padrão de fragmentação do EM da substância **1** obtido por CG-EM.

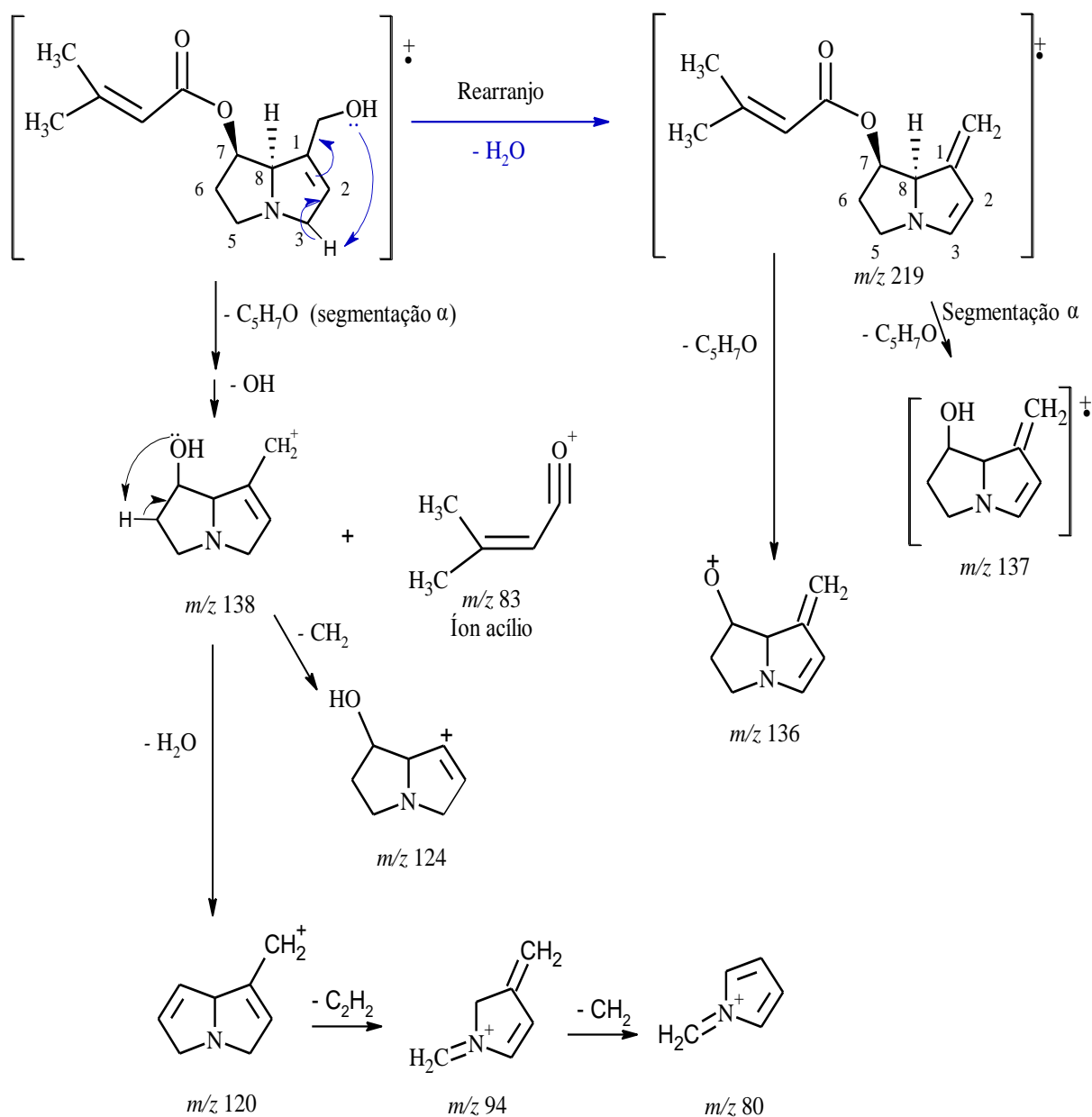


Figura 24. Fragmentação sugerida dos íons fragmentos da substância **1** (PAIVA, 2002; IBRAHIM, 2007; LIU *et al.*, 2009; PAVIA, 2012).

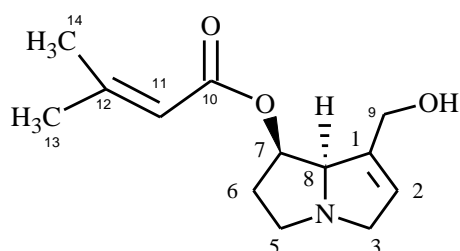


Figura 25. Estrutura química da 7-senecioidretronecina.

Substância 2

O sinal **2** ilustrado no cromatograma (Figura 22) apresentou o espectro de massas com uma série de íons fragmentos de m/z 154, 138, 137, 94 e 93, representado na Figura 26 e descritos na Tabela 6, que também são característicos de APs monoéster 1,2-insaturados e esterificados no C-9 (WITTE *et al.*, 1993). O íon de m/z 138 resulta da fragmentação conhecida como segmentação α do grupamento ester alílico $[M - C_5H_8O_2]^+$, característico de éster (IBRAHIM, 2007; PAVIA, 2012). O íon de m/z 154 originou da cisão do éster pelo mecanismo de formação do íon acílio (PAVIA, 2012). O íon de m/z 137 teve sua formação sugerida a partir da substância **2** por um mecanismo de segmentação α , que por sua vez originou o íon de m/z 93 por uma cisão homolítica entre C-5 e C-6 e entre C-7 e C-8, seguido de rearranjo. A formação sugerida dos íons fragmentos podem ser observadas na Figura 27. A substância **2** foi identificada pela comparação dos seus padrões de fragmentação com os citados na literatura (WITTE *et al.*, 1993; EL-SHAZLY *et al.*, 1996a) como sendo 9-angeloilretronecina (Figura 28). Ela possui como pico base o íon fragmento de m/z 93 que o diferencia do seu isômero seneci oil.

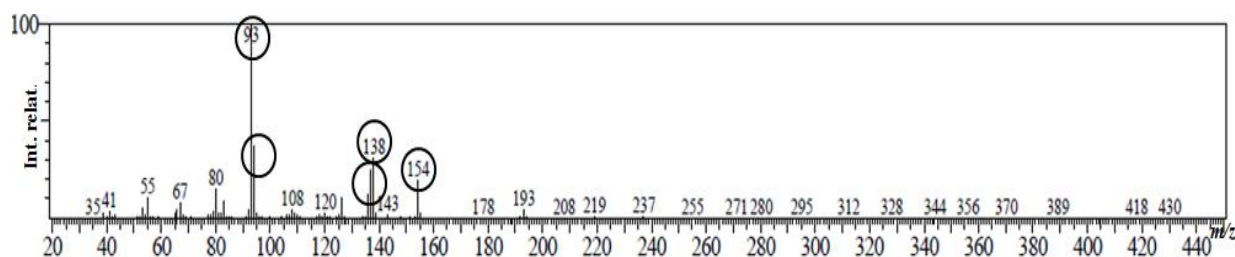


Figura 26. Padrão de fragmentação do EM da substância **2** obtido por CG-EM.

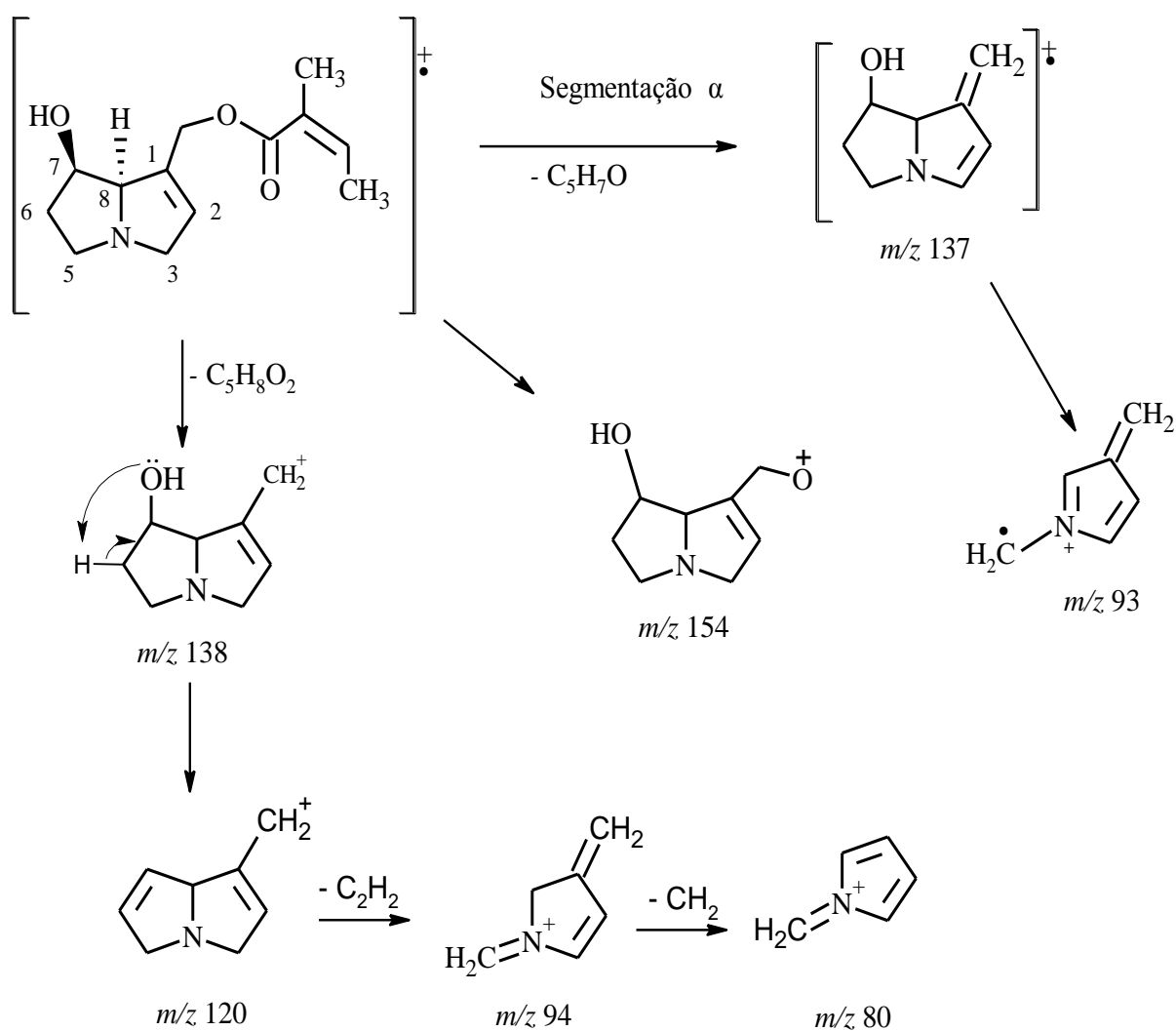


Figura 27. Formação sugerida para os íons fragmentos da substância 2 (EL-SHAZLY *et al.*, 1996a; PAIVA, 2002; IBRAHIM, 2007)

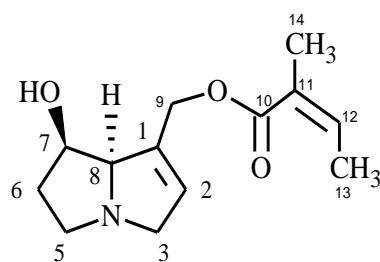


Figura 28. Estrutura química de 9-angeloilretronecina.

Substância 3

O sinal **3** do cromatograma (Figura 22) também apresentou os íons fragmentos característicos de APs 1,2 insaturados, ilustrados na Figura 29 e descritos na Tabela 6. O íon fragmento de m/z 138 (pico base) originou da clivagem do ester alílico evidenciando a presença de um grupo OH no carbono C-7 (WITTE *et al.*, 1993). Os íons fragmentos de m/z 138, 94, 93 e m/z 80 tiveram suas formações sugeridas idênticas ao da 9-angeloilretronecina, representado na Figura 27 (PAIVA, 2002; IBRAHIM, 2007). Os valores dos íons e as respectivas intensidades relativas foram comparados com os padrões de fragmentação descritos na literatura (EL-SHAZLY *et al.*, 1996b; WITTE *et al.*, 1993) que permitiu a identificação da substância como licopsamina (Figura 30).

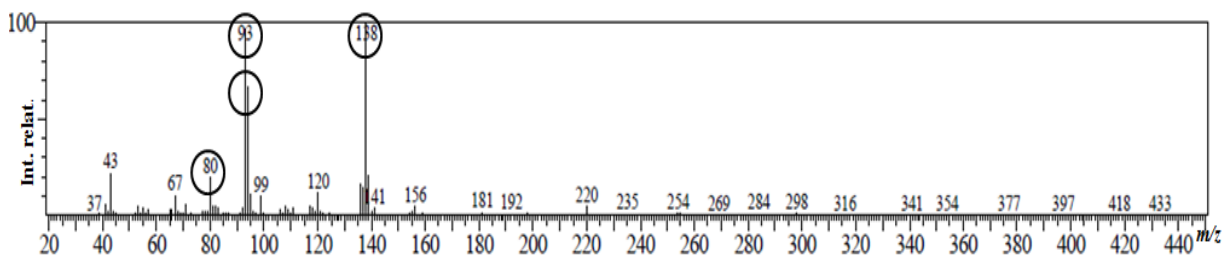


Figura 29. Padrão de fragmentação do EM da substância **3** obtido por CG-EM.

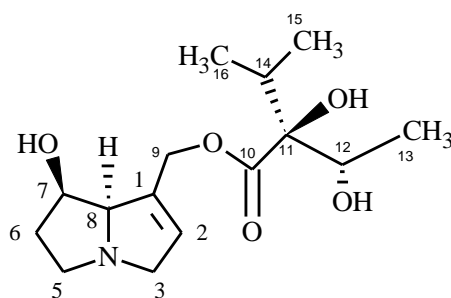


Figura 30. Estrutura química de licopsamina.

Substância 4

O espectro de massas do sinal **4** do cromatograma (Figura 22) apresentou os íons fragmentos de m/z 180 (pico base), 136, 120 e m/z 93, ilustrados na Figura 31 e descritos na Tabela 6 que são também típicos de APs insaturados na posição C-1/C-2 (WITTE *et al.*, 1993). O íon fragmento de m/z 180 é típico de 7-acetil ésteres e teve a sua formação a partir da perda do ácido em C-9 (Figura 32). A presença de um íon de m/z 43 e ausência de íons de m/z 83 e m/z 55 apresenta a evidência da presença de um grupo acetato no carbono C-7 e a ausência de ácido angélico ou seu isômero (EL-SHAZLY *et al.*, 1996a). A formação sugerida dos íons fragmentos de m/z 180, 120 e m/z 93 estão ilustrados na Figura 32 e Figura 27, respectivamente. Enquanto, a formação do íon fragmento de m/z 136 pode ser observado na Figura 24 devido a semelhança dos mecanismos de formação. A substância **4** foi então identificada como 7-acetil-licopsamina (Figura 33).

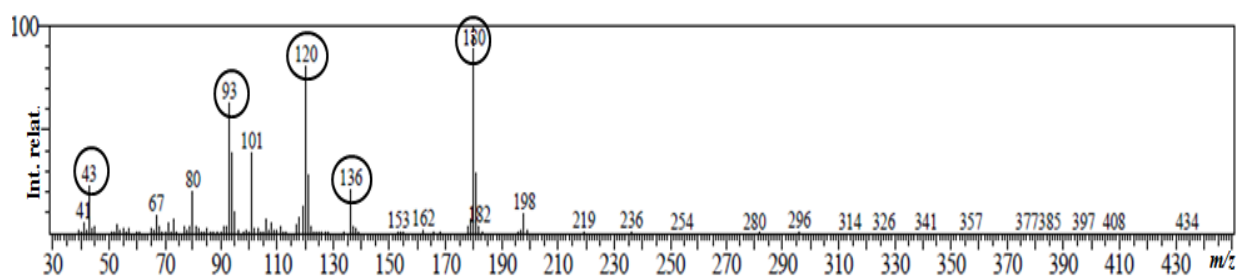


Figura 31. Padrão de fragmentação do EM da substância **4** obtido por CG-

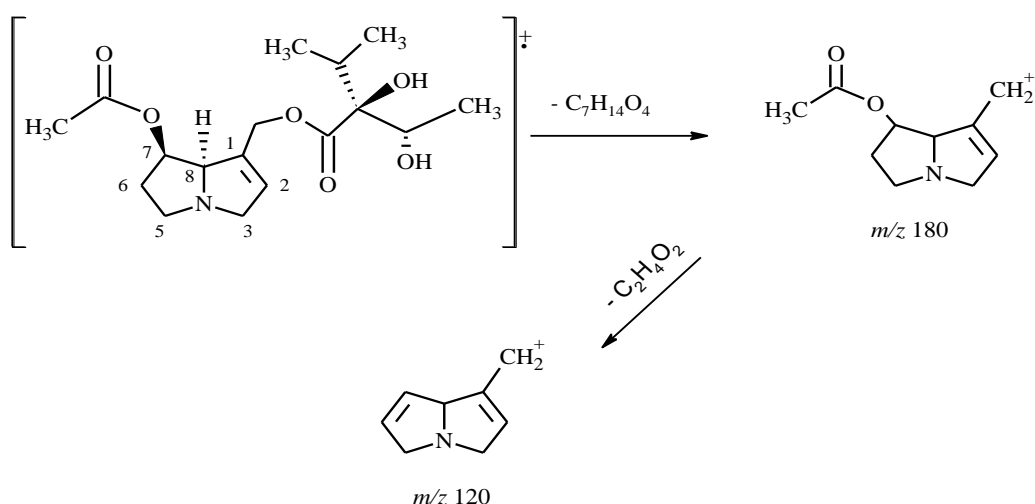


Figura 32. Formação sugerida para os íons em m/z 180 e m/z 120 (EL-SHAZLY *et al.*, 1996a).

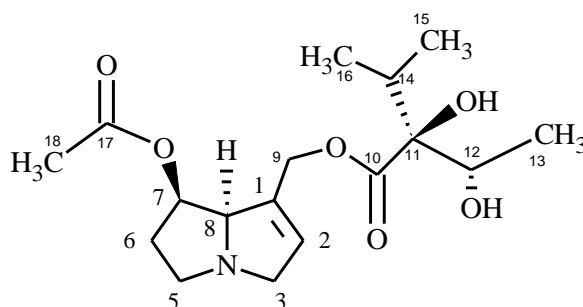


Figura 33. Estrutura química de 7-acetil-licopsamina

Substância 5

O sinal **5** no cromatograma (Figura 22) apresentou maior intensidade e uma série de íons fragmentos de m/z 136, 120, 119, 93 e m/z 80, característicos de alcaloides pirrolizidínicos diésteres 1,2 insaturado (PEDERSEN e LARSEN, 1970; EL-SHAZLY *et al.*, 1996b), ilustrado na Figura 34 e descritos na Tabela 6, com uma semelhança de 90% para equimidina segundo a biblioteca NIST do aparelho. O íon fragmento com pico base em m/z 220 foi formado devido a clivagem do éster alílico em C-9. Enquanto, o íon fragmento de m/z 120 originou-se da clivagem em C-7 (EL-SHAZLY *et al.*, 1996b). O íon de m/z 136 foi formado a partir do íon de m/z 219 através de cisão heterolítica entre a carbonila e o oxigênio do éster. Os íons de m/z 83 e m/z 55 correspondem ao ácido saturado em C-7 (ácido 3-metilbutanoico) (EL-SHAZLY *et al.*, 1996b). As fragmentações propostas para os íons obtidos estão descritas na Figura 35. A substância **5** foi posteriormente isolada a partir de uma cromatografia em coluna com SephadexTM LH-20 da fração alcaloídica HFA1 e sua estrutura determinada por métodos espectroscópicos como EM e RMN de 1D e 2D.

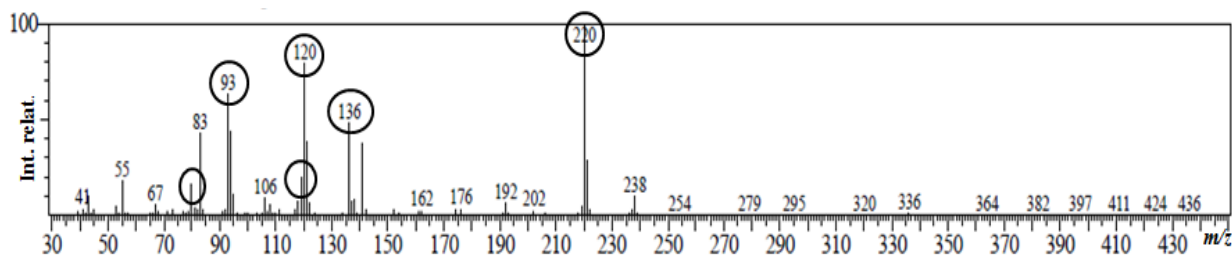


Figura 34. Padrão de fragmentação do EM da substância **5** obtido por CG-EM.

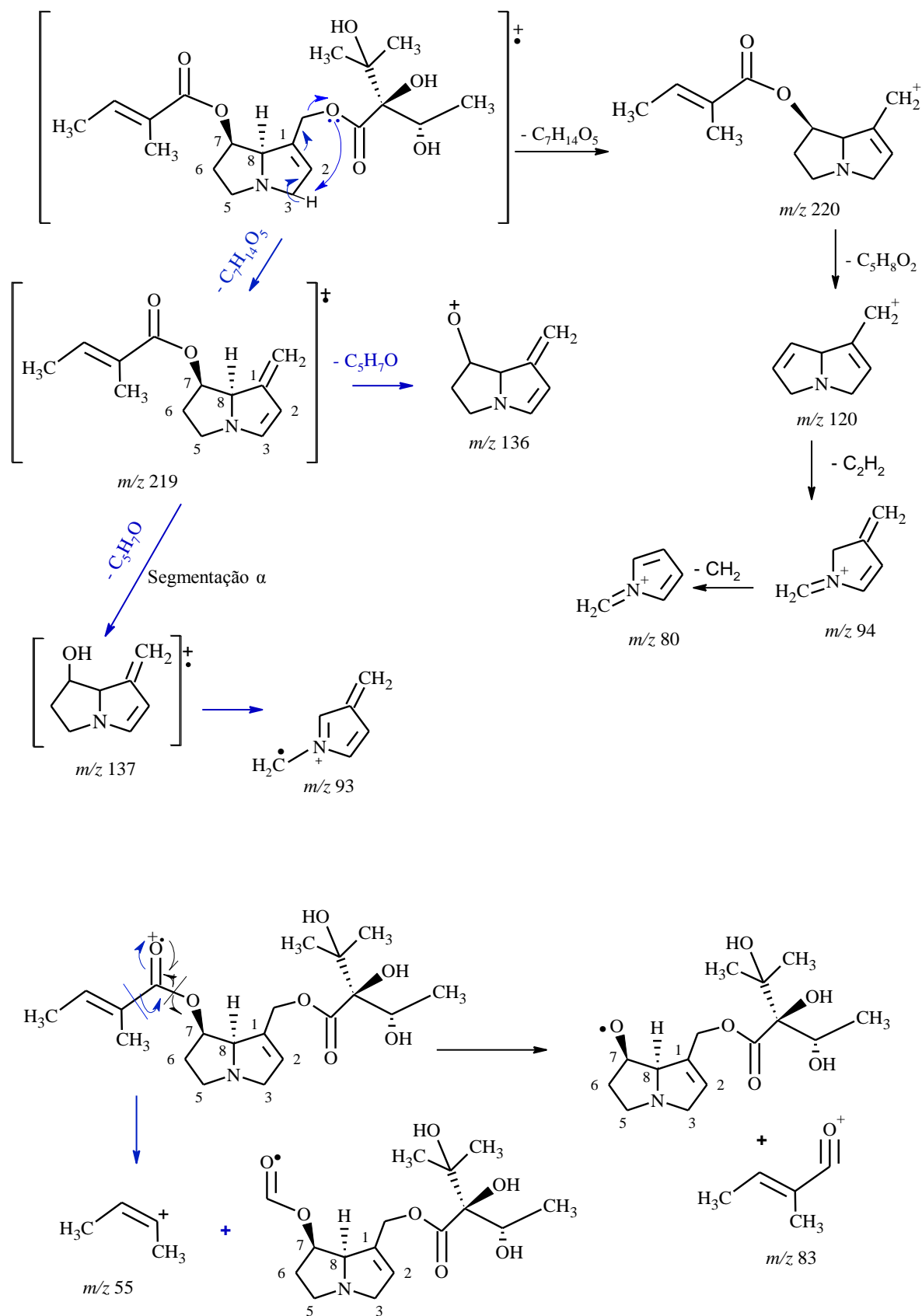


Figura 35. Formação proposta para os íons fragmentos da substância **5** (EL-SHAZLY *et al.*, 1996a; PAIVA, 2002; IBRAHIM, 2007).

A Coluna de filtração em gel de SephadexTM LH-20 forneceu a substância **5** (17 mg) como um resíduo marrom e aspeto de goma, cujo espectro de RMN de ¹H (300 MHz) apresentou valores de deslocamentos químicos (δ) típicos do anel da base necina quando comparado com os dados da literatura que estão descritos na Tabela 5. Os valores de deslocamentos químicos de hidrogênio mais comumente utilizado na identificação do núcleo pirrolizidínico são aqueles ligados aos carbonos C-2, C-6, C-7, C-8, e C-9 (LOGIE *et al.*, 1994).

Tabela 5. Dados de deslocamentos químicos típicos de RMN de ¹H (CDCl₃) da base necina e valores observados no núcleo pirrolizidínico da substância **5**.

Nº de próton	*Valor típico δ (ppm)	Valor encontrado δ (ppm)
2	5,84	5,92
6	2,11	2,02
7	5,42	5,33
8	4,36	4,48
9	4,67-4,85	4,69; 4,88

*LOGIE *et al.*, 1994 (CDCl₃).

No espectro de RMN de ¹H, a presença de um singlete em δ_H 5,92 foi atribuído ao hidrogênio ligado ao C-2, por ser o mais desblindado da molécula. Os multipletos em δ_H 3,58 e 3,68 foram atribuídos aos prótons não equivalentes ligados ao C-3, devido a estrutura não planar do núcleo pirrolizidínico. O mesmo acontece com os prótons H-5, que apresentou dois multipletos em δ_H 3,42 e 2,87. Os prótons metílicos apresentaram seus δ_H na faixa de 1,80 a 1,20 (PAVIA *et al.*, 2012). O espectro de RMN de ¹H em 2D, o HSQC auxiliou na determinação estrutural e mostrou a presença de cinco metilas referentes aos substituintes (ácidos equimidínicos) ligados ao anel da base necina, conforme previamente descrito na literatura para o gênero *Echium* (EL-SHAZLY *et al.*, 1996a; MEHRABANI *et al.*, 2006) .

O espectro de RMN de ¹³C (Figura 36) exibiu quatro sinais na região de olefina, em δ_C 132,0 e 126,3; 141,2 e 123,3, indicando a dupla ligação entre C-1 e C-2 e entre C-18 e C-19, respectivamente. Além da presença dos carbonos olefínicos, foram apresentados os carbonos carbonílicos em δ_C 174,4 (C-10) e 165,71 (C-17), conforme descrito na literatura (EL-SHAZLY *et al.*, 1996a,b; MEHRABANI *et al.*, 2006). Os sinais em δ_C 73,4 (C-8), 72,1 (C-7)

e 32,61 (C-6) confirmam a presença da base retronecina diéster (ROEDER *et al.*, 1991). Os deslocamentos químicos na região de 60,5 (C-3), 53,8 (C-5) a 73,4 ppm (C-8) são típicos de alcaloides pirrolizidínicos (ROEDER, 1990). A Figura 37 ilustra a estrutura detalhada da base necina. Os valores de δ de ^1H e ^{13}C obtidos estão descritos na tabela 9.

Os dados obtidos de RMN de ^1H e ^{13}C e massas foram comparados com os descritos na literatura que permitiu a identificação da substância **5** como equimidina (Figura 38). Esta substância pode apresentar sob duas conformações (*cis* e *trans*). Portanto, foi analisado o espectro de HSQC que apresentou duas metilas *cis* em δ_{H} 1,79 e 1,77, condizente com o descrito na literatura para a *Echium amoenum* (MEHRABANI *et al.*, 2006).

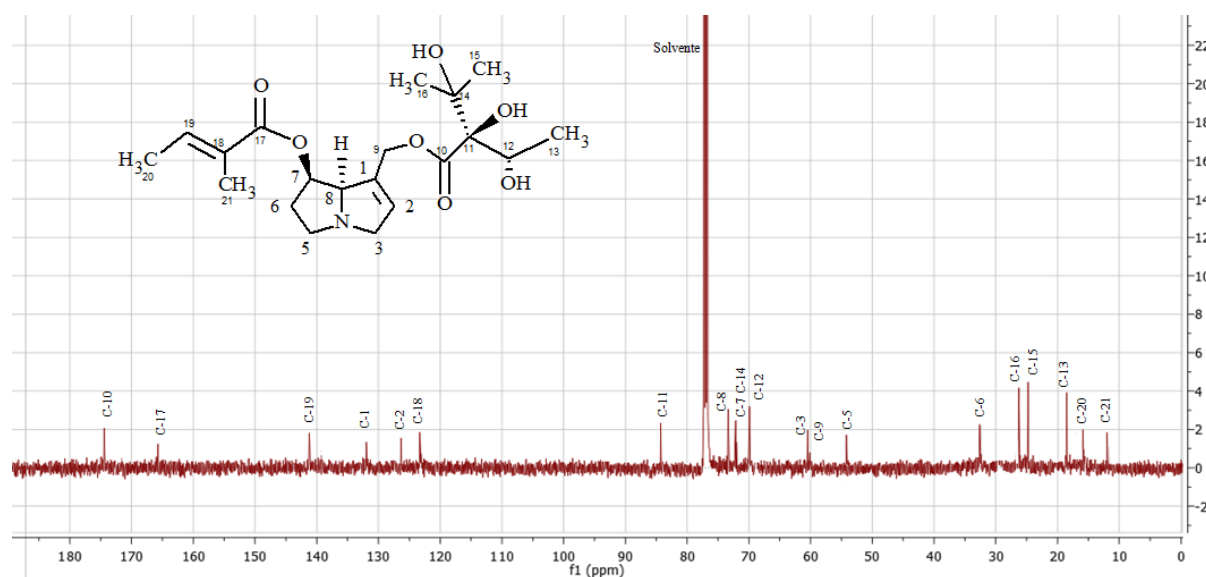


Figura 36. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância **5**.

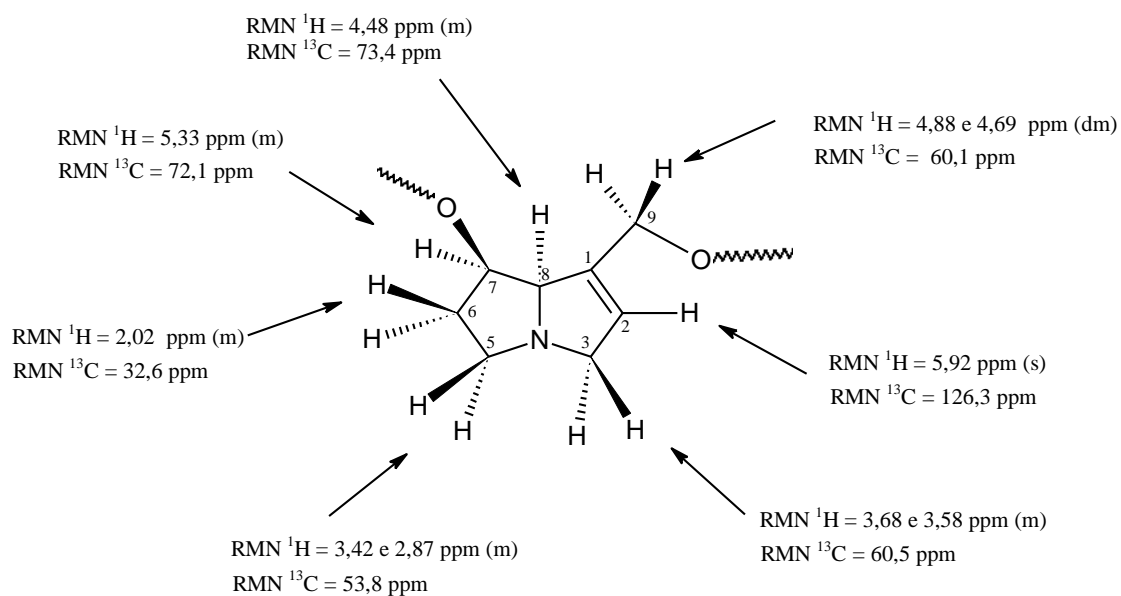


Figura 37. Detalhes da estrutura da base necina da substância **5** com seus respectivos valores de δ de ^1H e ^{13}C .

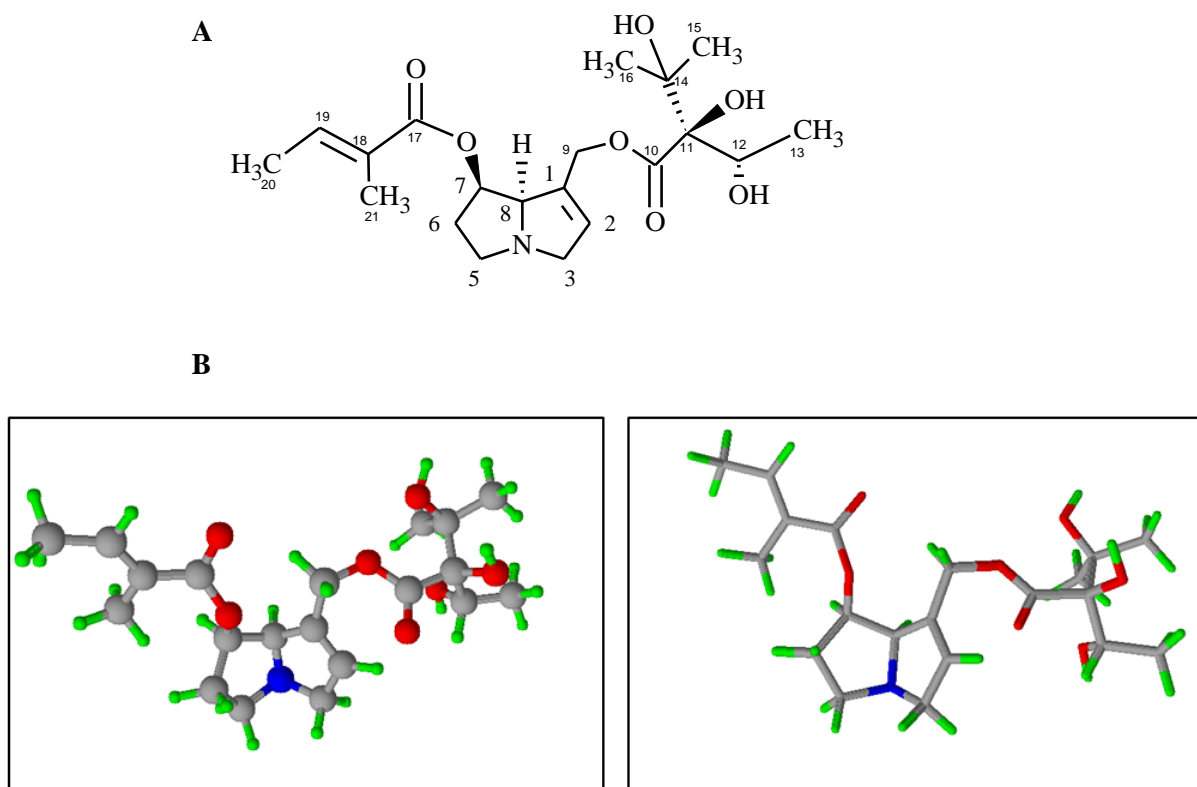


Figura 38. Estrutura química - A e estruturas tridimensionais - B da equimidina mostrando a conformação do anel da base necina.

Substância 6

O sinal **6** do cromatograma (Figura 22) apresentou o espectro de massas da substância com uma série de íons fragmentos de m/z 222 (pico base), 136, 120, 93 e m/z 80, ilustrados na Figura 39 e descritos na Tabela 6, típicos de alcaloides pirrolizidínicos diésteres 1,2 insaturados (PEDERSEN e LARSEN, 1970). O íon fragmento de m/z 222 origina-se devido a clivagem do ester alílico $[M - \text{ácido equimidínico (C}_7\text{H}_{14}\text{O}_5)]^+$ em C-9. Enquanto, o íon fragmento de m/z 120 é formado a partir da clivagem do éster alílico em C-7. O fragmento em m/z 59 corresponde ao radical $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}$. Os íons m/z 85 e m/z 57 são correspondentes ao ácido saturado em C-7 (ácido 2-metilbutanoico) (EL-SHAZLY *et al*, 1996b). O íon de m/z 136 é formado a partir do rearranjo de McLafferty, característico de ésteres de metila em C-9 seguido de uma cisão heterolítica entre a carbonila e o oxigênio do éster (PAVIA, 2012). No caso do íon acílo de m/z 85, a sua formação ocorre devida a uma clivagem α que é típica de éster em C-7 (IBRAHIM, 2007; PAVIA, 2012). A Figura 40 ilustra os mecanismos sugeridos para a formação desses fragmentos. Desta forma, foi possível identificar a substância **6** como o 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina (Figura 41).

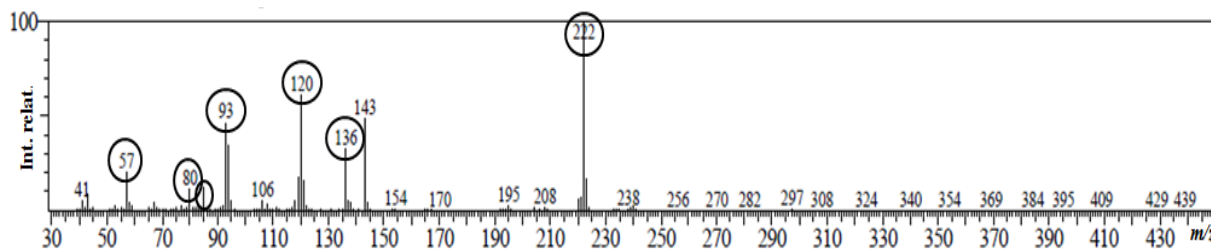


Figura 39. Padrão de fragmentação do EM da substância **6** obtido por CG-EM.

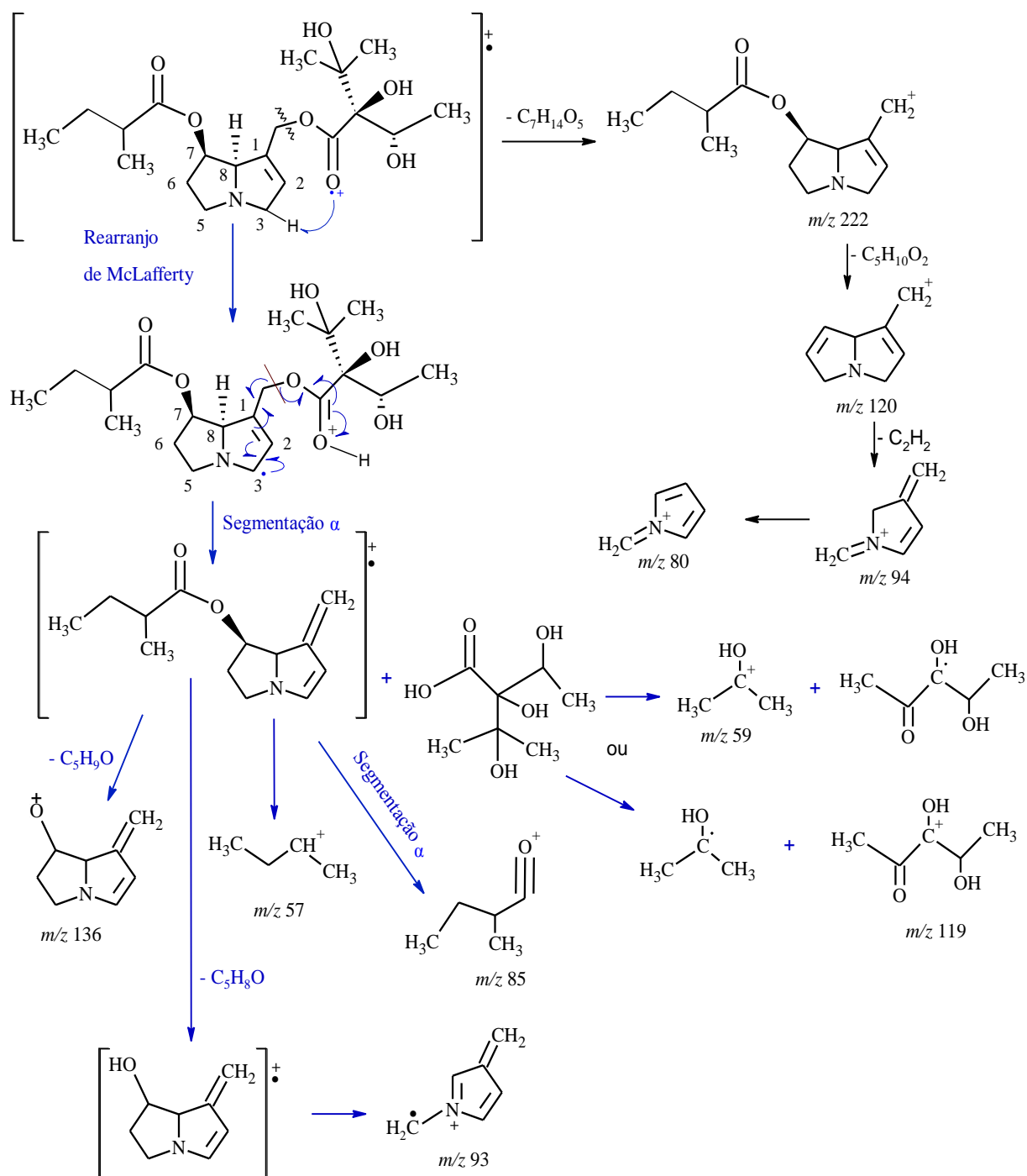


Figura 40. Formação proposta dos íons fragmentos da substância **6** (EL-SHAZLY *et al*, 1996b; PAIVA, 2002; IBRAHIM, 2007). Setas azuis: mecanismo de formação dos íons m/z 136, 119, 93, 85, 59 e m/z 57. Setas pretas: mecanismo de formação dos íons m/z 222, 120, 94 e m/z 80.

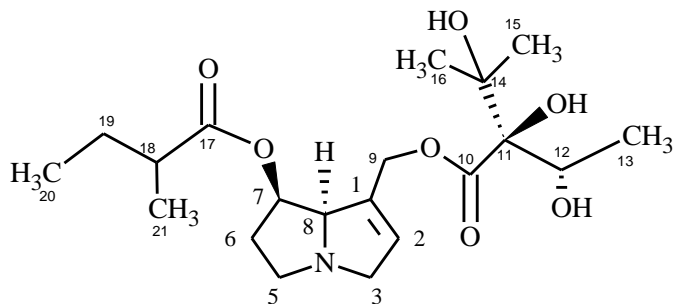


Figura 41. Estrutura química da 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina.

Substância 7

O espectro de massas obtido para o sinal **7** do cromatogram (Figura 22) apresentou como pico base o íon fragmento de m/z 220 e uma série de íons fragmentos de m/z 136, 120, 119, 93 e m/z 80, ilustrados na Figura 42 e descritos na tabela 6 que são característicos de APs diésteres 1,2 insaturados (PEDERSEN e LARSEN, 1970; EL-SHAZLY *et al.*, 1996b). O pico base em m/z 220 é resultante da quebra do éster alílico em C-9 (PEDERSEN e LARSEN, 1970). Os padrões de fragmentação são semelhantes ao da equimidina (**5**), diferenciando apenas na intensidade dos sinais (ver tabela 6). A formação sugerida dos íons são semelhantes ao da equimidina e 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina, ilustrados nas Figuras 35 e 40, respectivamente. Com base nos dados de fragmentação do espectro de massas e a comparação com os dados da literatura, a substância **7** foi identificada como equihumilina ou 7-senecioil-9-equimidinilretronecina (Figura 43).

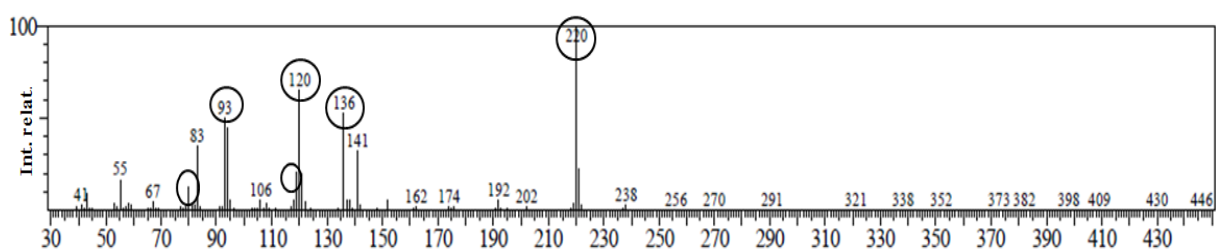


Figura 42. Padrão de fragmentação do EM da substância **7** obtido por CG-EM.

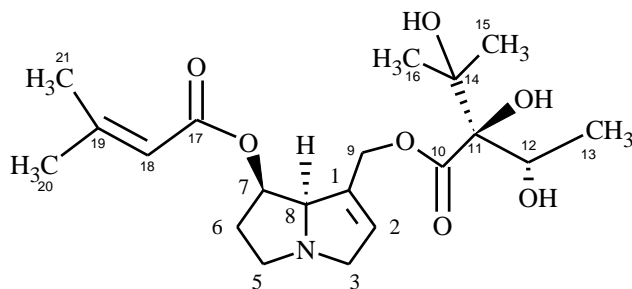


Figura 43. Estrutura química da equihumilina.

Tabela 6. Alcaloides pirrolizidínicos identificados no *E. hypertropicum* por GC-MS.

Nº	Alcaloide	[M ⁺]	íons característicos m/z (abundância relativa)	*Ref.
1	7-senecioldretronecina	237	219 (4), 149(3), 137(17), 136(16), 124(17), 111(29), 106(41), 94(29), 85(5), 83(9), 80 (100), 68(8), 57(2), 55(12).	2
2	9-angeloldretronecina	237	219(<1), 193(5), 154(20), 138(30), 137(25), 136(13), 126(10), 94(37), 93(100), 83(8), 80(15), 67(8), 55(10).	1, 3
3	Licopsamina	299	299(<1), 254(1), 156(5), 139(21), 138(100), 137(14), 136(16), 120(12), 108(5), 95(11), 94(67), 93(97), 80(19), 67(10), 45(1), 43(22).	2, 3
4	7-acetil-licopsamina	341	341(<1), 198(10), 181(29), 180(100), 179(7), 136(21), 121(28), 120(80), 119(13), 101(39), 95 (10), 80(20), 94(38), 93(63), 79(3), 73(7), 67(8), 45(4), 43(23).	2
5	Equimidina	397	238(10), 221(29), 220(100), 219(4), 141(37), 138(8), 137(7), 136(48), 121(38), 120(79), 119(20), 106(9), 94(44), 93(63), 83(43), 80(16), 67(5), 55(18), 45(3), 43(10).	2
6	7-(2-metilbutiril)-9-echimidinildretronecina	399	238(<1), 223(17), 222(100), 221(7), 143(49), 138(4), 137 (5), 136(33), 121(16), 120(62), 119(17), 106(5), 94(34), 93(47), 85(12), 80(11), 59(2), 57(20), 53(3), 43(9), 41(5).	2
7	Equihumilina	397	238(3), 221(22), 220(100), 219(4), 141(32), 138(6), 137(6), 136(53), 121(20), 120(65), 119(21), 118(6), 106(6), 95(6), 94(45), 93(50), 83(35), 80(13), 67(5), 59(3), 55(17), 53(4), 43(10), 41(3).	2

* ¹El-Shazly et al., 1996a; ²El-Shazly et al., 1996b; ³Witte et al., 1993;

4.7.1.2 Alcaloides pirrolizidínicos totais

Duas substâncias foram isoladas por CCD em escala preparativa das sub-frações EH3b e EH3c (24-48) e analisadas por CG-EM, apresentando no cromatograma dois sinais de tempos de retenção próximos (10,1 min e 10,2 min), cujos os respectivos padrões de fragmentação de massas foram semelhantes aos obtidos para as substâncias **1** e **2**, previamente identificadas na fração em éter da *E. hypertropicum* sem adição de Zn (Figura 22, 23 e 26). Desta forma, as substâncias foram identificadas como sendo a 7-senecioilretronecina (**1**) e a 9-angeloilretronecina (**2**), que são isômeros de posição (Figura 45). Segundo IBRAHIM (2007), os substituintes podem ser do tipo angeloil, senecioil ou tigloil (Figura 45) que apresentam deslocamentos típicos de RMN de ^1H , conforme descrito na Tabela 7. Portanto, uma dentre as duas substância isoladas, obtida em quantidade suficiente, foi também analisada por RMN de ^1H , apresentando no espectro um duplo quarteto em δ_{H} 6,13 ppm, característico do próton metilênico do substituinte angeloil, ilustrado na Figura 46 (ALALI, *et al.*, 2008). Os deslocamentos químicos de ^1H obtidos indicaram a presença de um substituinte em C-9 e os dados foram condizentes com os da literatura, ilustrados na Figura 44 (IBRAHIM, 2007). Assim, foi possível a identificação da substância como sendo a 9-angeloilretronecina (**2**).

Os alcaloides 7-senecioilretronecina e 9-angeloilretronecina foram identificados nos métodos com e sem adição de Zn, sugerindo que estes se encontram na forma de base livre nas folhas de *E. hypertropicum*.

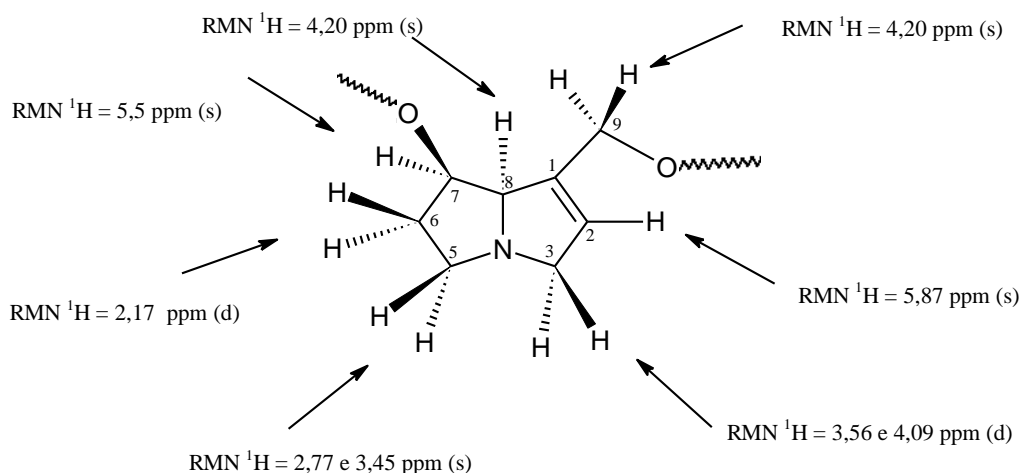


Figura 44. Estrutura da base necina com os respectivos δ de ^1H .

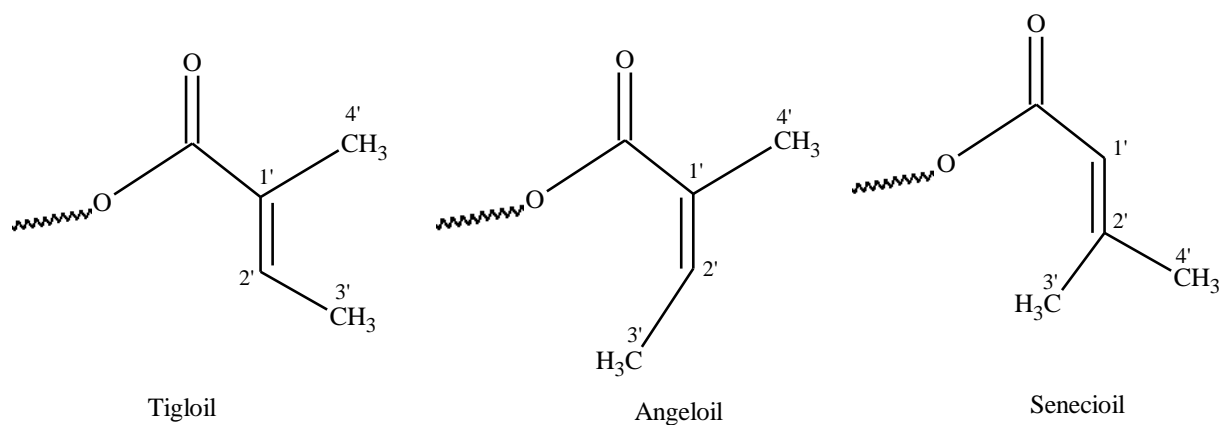


Figura 45. Isômeros de substituintes angeloil conhecidos. Fonte: IBRAHIM, 2007.

Tabela 7. Deslocamentos químicos característicos de ^1H para os três diferentes isômeros do substituinte angeloil.

Posição	RMN ^1H (ppm)		
	<i>O</i> -Tigloil	<i>O</i> -Angeloil	<i>O</i> -senecioil
1'	-	-	5,58 sept
2'	6,76 qq	6,07 qq	-
3'	1,77 dq	1,93 dq	1,88 d
4'	1,74 s	1,79 quin	2,13 d

Fonte: IBRAHIM, 2007.

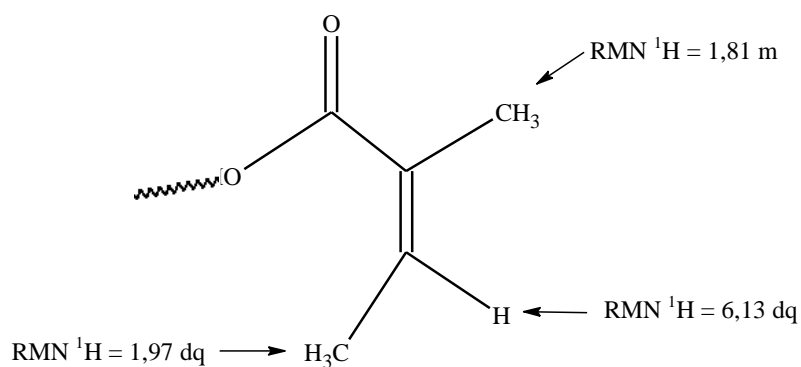


Figura 46. RMN de ^1H do substituinte angeloil encontrado para a substância 2.

4.7.2 Alcaloides da *Echium stenosphon subsp. stenosphon*

4.7.2.1 Alcaloides pirrolizidínicos terciários

A fração alcaloídica em diclorometano (SFA1), após a análise por ESI-Q-TOF EM, apresentou um espectro de massas com uma molécula protonada em m/z 400 $[M+H]^+$ de maior intensidade (Figura 47) e outras duas moléculas protonadas em m/z 398 $[M+H]^+$ e m/z 400 $[M+H]^+$.

A fração SFA1 também foi submetida à cromatografia com SephadexTM LH-20, fornecendo um sólido (59 mg) com aspecto de goma de coloração marrom, que após a análise por ESI (+) Q-TOF EM apresentou o espectro de massas com o peso molecular de 399 unidades de massa atômica, correspondente à sua espécie protonada em m/z 400 $[M+H]^+$ (Figura 48). A mesma sofreu uma ativação colisional (AC) que resultou na migração do próton do nitrogênio do anel pirrolizidínico para o oxigênio ligado ao carbono C-9. Esta migração do próton obedece o conceito do próton móvel (DONGRÉ *et al.*, 1996), conforme apresentado na Figura 49. Os íons fragmentos característicos de m/z 222 $[400 - C_7H_{14}O_5]^+$ e m/z 120 $[400 - C_7H_{14}O_5 - C_5H_{10}O_2]^+$ (100 %) correspondem aos íons resultantes da fragmentação em C-9 e C-7, respectivamente, apresentados na Figura 49.

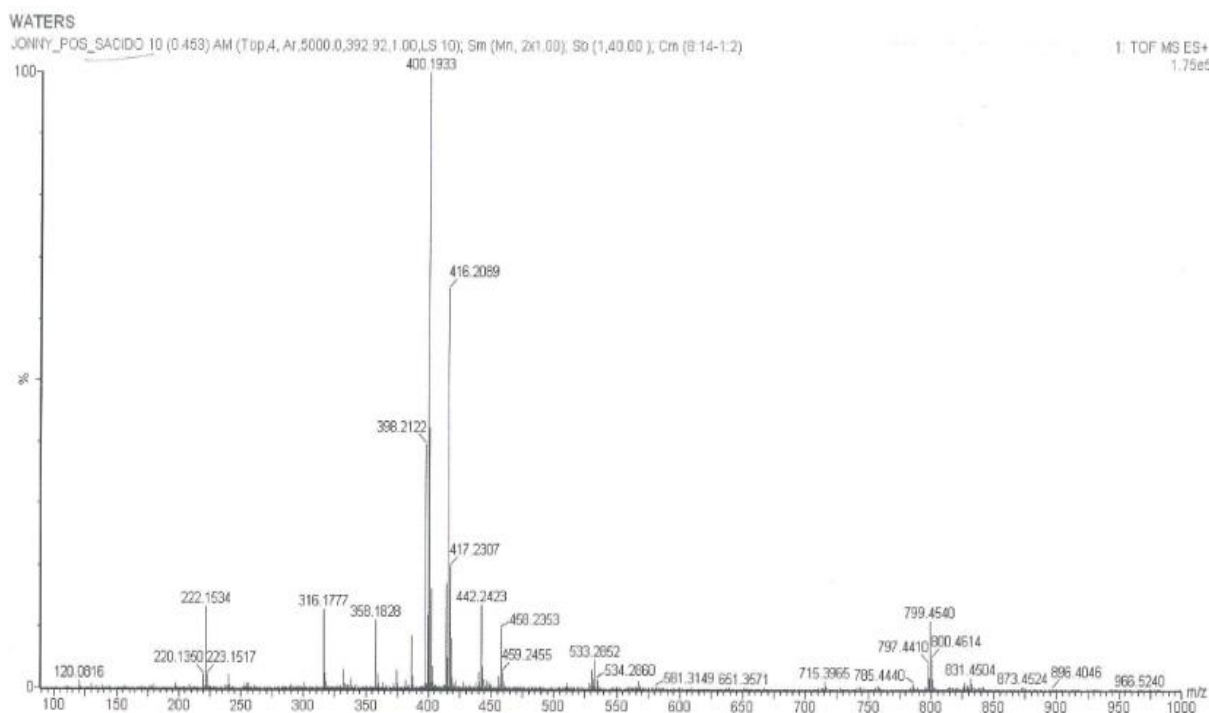


Figura 47. Espectro de massas (+)-ESI-Q-TOF EM da fração em diclorometano SFA1 da *Echium stenosphon*.

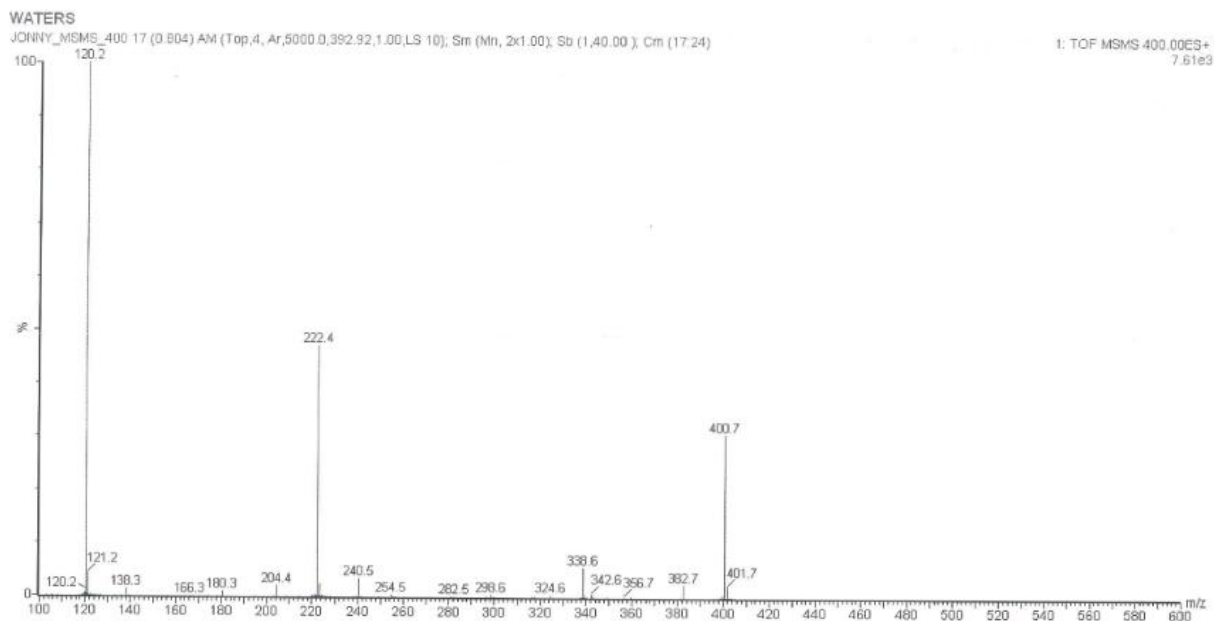


Figura 48. ESI-MS/MS fragmentação da molécula protonada em m/z 400 $[M+H]^+$.

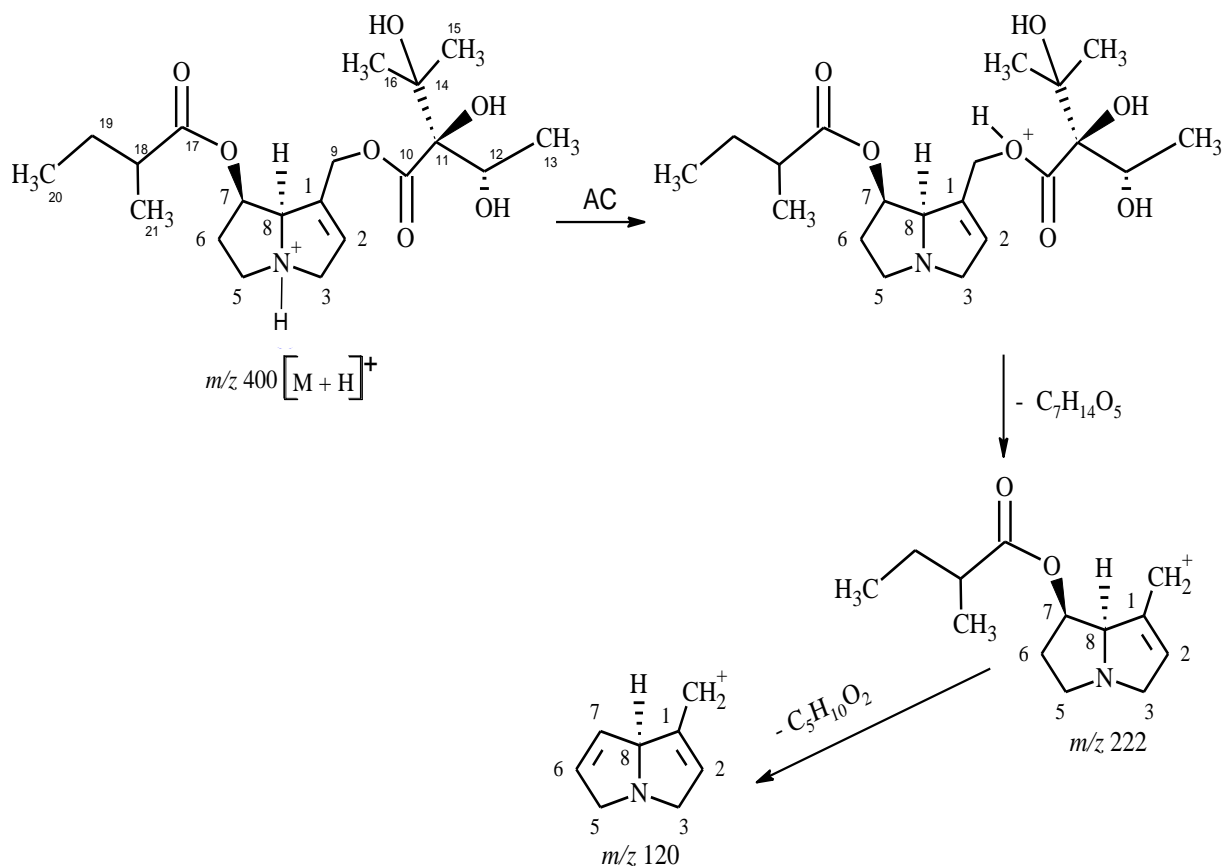


Figura 49. Estruturas sugeridas para os fragmentos mais abundantes da molécula protonada em m/z 400 $[M+H]^+$ observadas no ESI-MS/MS.

A substância isolada por cromatografia em SephadexTM LH-20 referente à molécula protonada em m/z 400 $[M+H]^+$ foi posteriormente analisada por RMN de 1H e ^{13}C . Os valores de deslocamentos químicos obtidos e os descritos na literatura para o anel da base necina estão listados na Tabela 8. Os valores dos deslocamentos químicos (δ) dos hidrogênios do anel da base necina são bem distintos e possibilitou o seu assinalamento e a comparação com os relatados na literatura (LOGIE *et al.*, 1994). Os valores de deslocamentos químicos de hidrogênios mais comuns são aqueles ligados aos carbonos C-2, C-6, C-7, C-8, e C-9 (LOGIE *et al.*, 1994). O sinal em δ_H 5,80 ppm foi relacionado ao hidrogênio ligado ao C-2. Os deslocamentos químicos obtidos foram semelhantes aos da equimidina identificada anteriormente em *Echium humile* (EL-SHAZLY *et al.*, 1996b). A presença de dois multipletos em δ_H 2,37 e 1,82 foram atribuídos aos prótons H-18 e H-19, respectivamente, que diferenciam esta substância da equimidina pela ausência nesta do próton H-18 e pela presença de um sinal muito desblindado em δ_H 6,16 atribuído ao H-19. O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 50) apresentou dois sinais na região característica de olefina, em δ_C 132 e 126, confirmando a presença da dupla ligação entre C-1 e C-2, além da presença de carbonos carbonílicos em 175,3 (C-10) e 174,3 ppm (C-17) que são semelhantes aos descritos na literatura (EL-SHAZLY *et al.*, 1996a,b). A presença da base retronecina diester foi confirmada através da presença de sinais típicos em δ 76,1 (C-8), 73,4 (C-7) e 34,1 ppm (C-6) (ROEDER *et al.*, 1991). Outros sinais característicos de alcaloides pirrolizidínicos foram observados em 61,38 ppm (C-3), 53,9 ppm (C-5) e 76,1 ppm (C-8) (ROEDER, 1990). Logo, os dados obtidos de RMN 1H e ^{13}C auxiliaram na elucidação estrutural e confirmaram a molécula protonada em m/z 400 $[M+H]^+$ como sendo a 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina (**6**) de fórmula molecular $C_{20}H_{33}NO_7$ (Figura 37), previamente isolada no gênero *Echium* (EL-SHAZLY *et al.*, 1996b), permitindo a comparação entre os dados conforme ilustrado na Tabela 9.

Tabela 8. Dados de deslocamentos químicos típicos de RMN de ^1H (CDCl_3) da base necina e valores obtidos para o núcleo pirrolizidínico referente a molécula protonada em m/z 400 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Nº de próton	*Valor típico δ (ppm)	Valor encontrado δ (ppm)
2	5,84	5,80
6	2,11	2,05
7	5,43	5,32
8	4,34	5,30
9	4,67-4,85	4,95; 5,02

*LOGIE *et al.*, 1994 (CDCl_3).

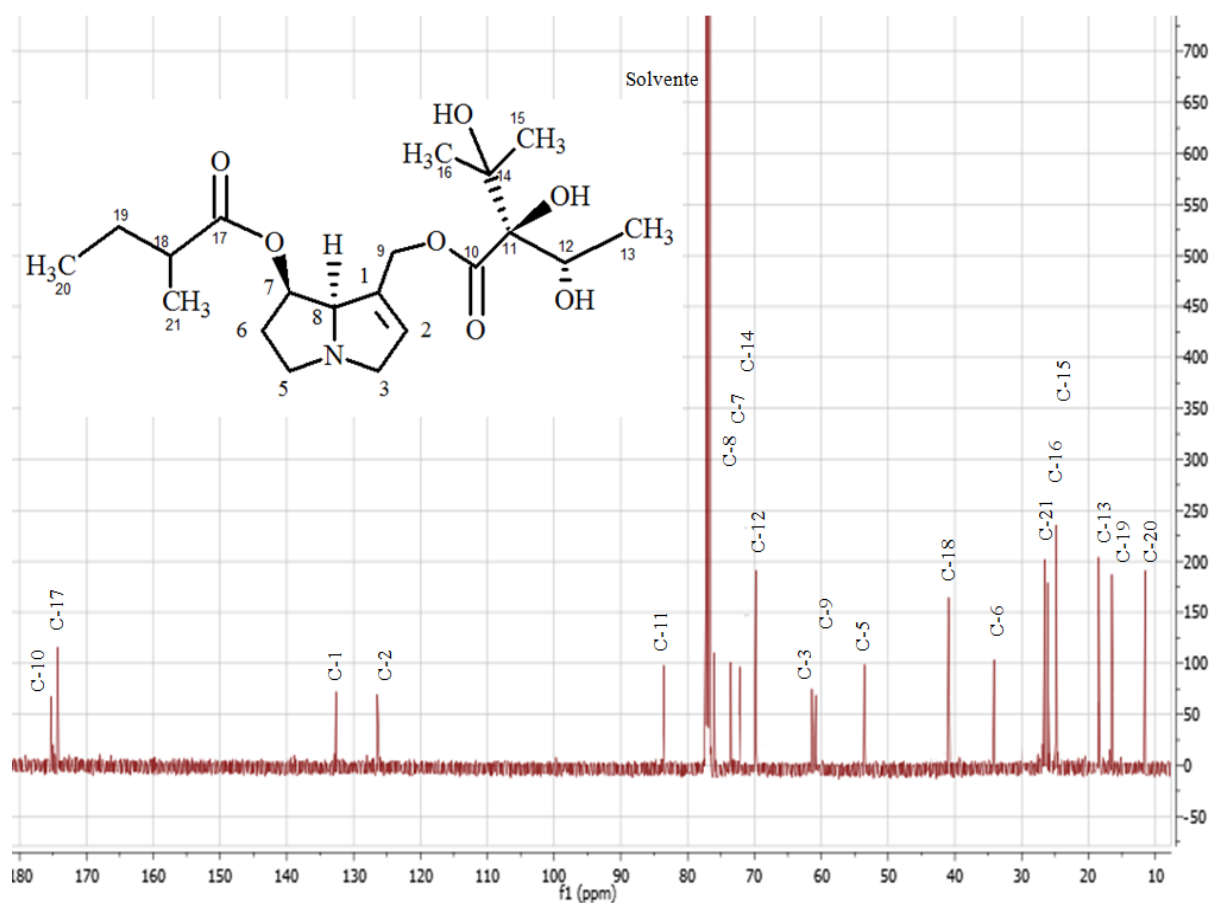


Figura 50. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da molécula protonada em m/z 400 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

A análise da fração SFA1 por ESI-Q-TOF EM apresentou também uma outra molécula protonada em m/z 398 $[M+H]^+$, que após sofrer uma ativação colisional (AC) no oxigênio ligado ao carbono C-9 (DONGRÉ *et al.*, 1996) apresentou no espectro EM/EM (Figura 51) fragmentos de m/z 220 $[398 - C_7H_{14}O_5]^+$ e m/z 120 $[398 - C_7H_{14}O_5 - C_5H_8O_2]^+$ (100 %), característicos de APs diesteres devido à perda dos ácidos nécicos em C-9 e C-7, respectivamente (Figura 52). Esta molécula possui menos duas unidades de massa atômica que a substância 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina e, assim permitindo a caracterização da molécula como sendo a equimidina (**5**) de fórmula molecular $C_{20}H_{31}NO_7$.

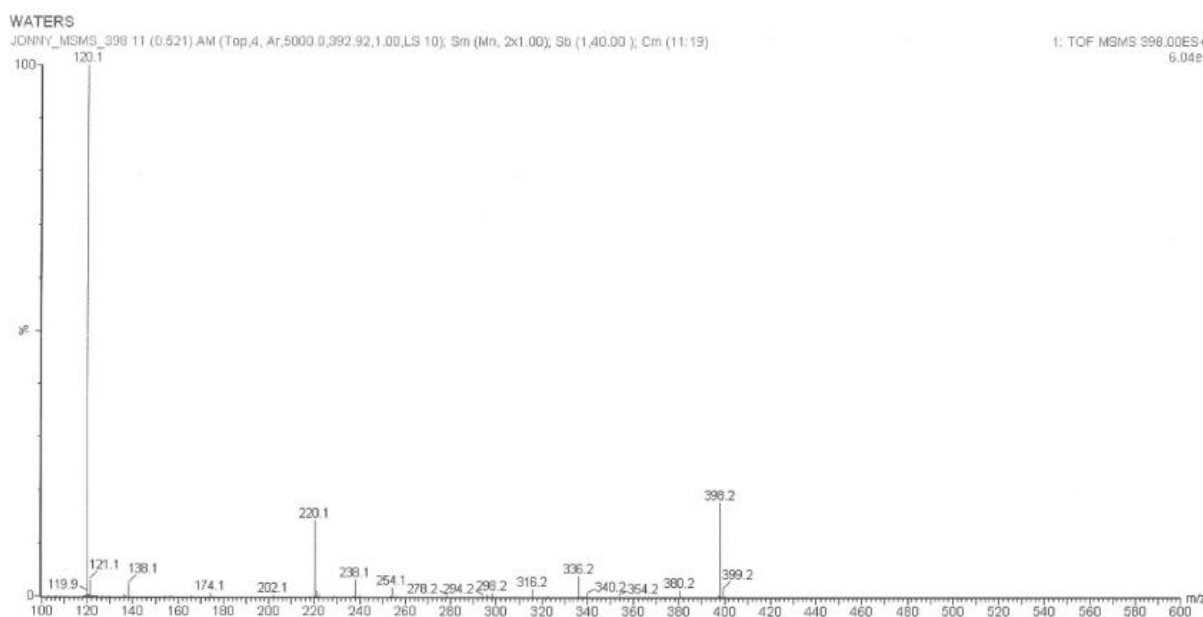


Figura 51. ESI-MS/MS fragmentação da molécula protonada em m/z 398 $[M + H]^+$.

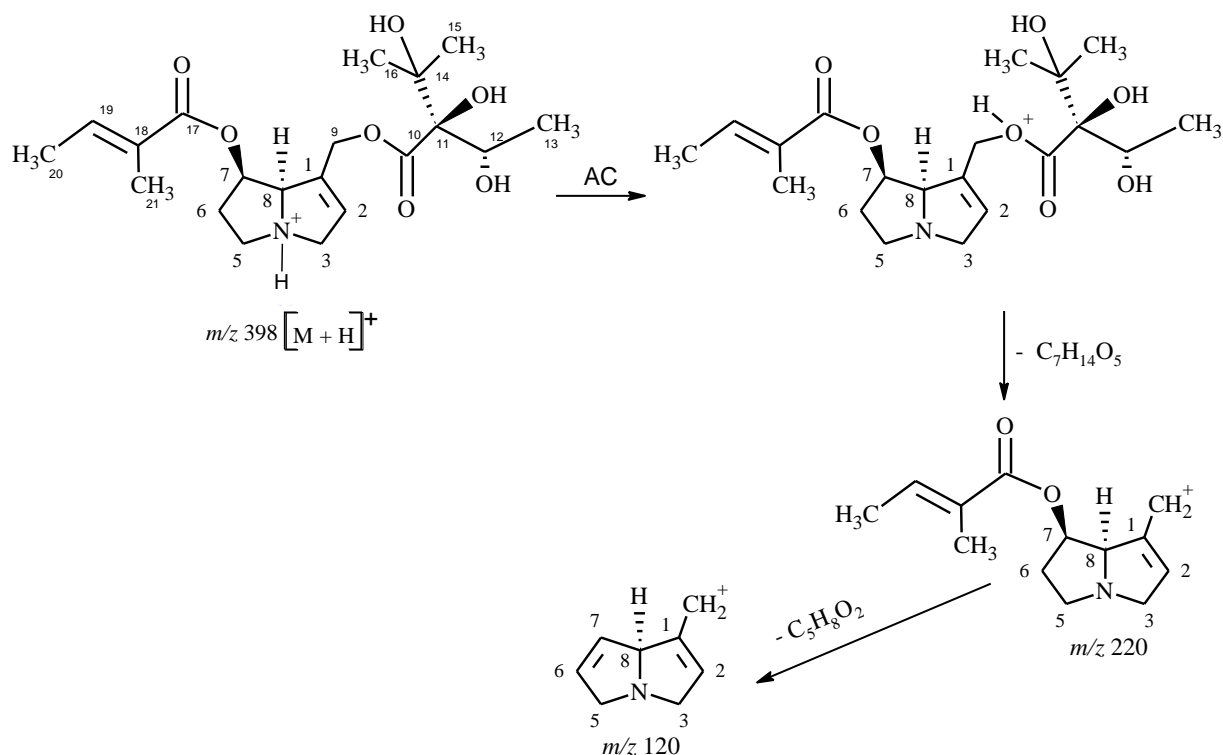


Figura 52. Estruturas sugeridas para os fragmentos mais abundantes da molécula protonada m/z 398 $[M + H]^+$ observada no ESI-MS/MS.

Em adição, o espectro de massas do SFA1 apresentou uma nova molécula protonada de m/z 416 $[M+H]^+$, cujo espectro MS/MS (Figura 53) mostrou a ausência do íon de m/z 120 (100%) característico da base necina devido a quebra da molécula em C-7 e C-9, conforme ocorrido com as substâncias 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina e equimidina. Isso sugere que a substância cuja molécula protonada tem m/z 416 $[M+H]^+$ possui uma base necina diferente da 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina e da equimidina. O íon quase molecular de m/z 416 possui 16 unidades de massa atômica a mais do que a molécula protonada de m/z 400 $[M+H]^+$ correspondente ao 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina, sugerindo a presença do *N*-óxido da substância 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina (**8**) (Figura 54). O padrão de fragmentação de massas apresentou os íons de m/z 416 (30 % rel. int) $[M + H]^+$, m/z 398(37), 354(30), 256(100), 222(18), 137(12) e m/z 120. A identificação de um *N*-óxido demonstra que não ocorreu a redução efetiva. Este é o primeiro relato da identificação da substância 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina *N*-óxido (**8**) no gênero *Echium*.

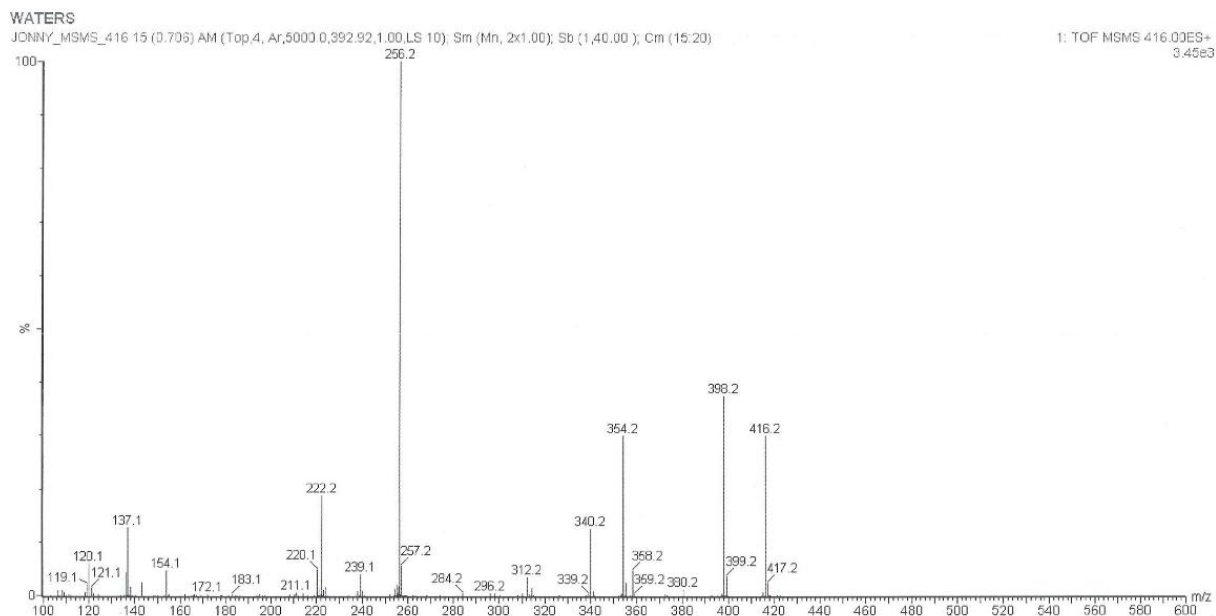


Figura 53. ESI-MS/MS fragmentação da molécula protonada em m/z 416 $[M+H]^+$.

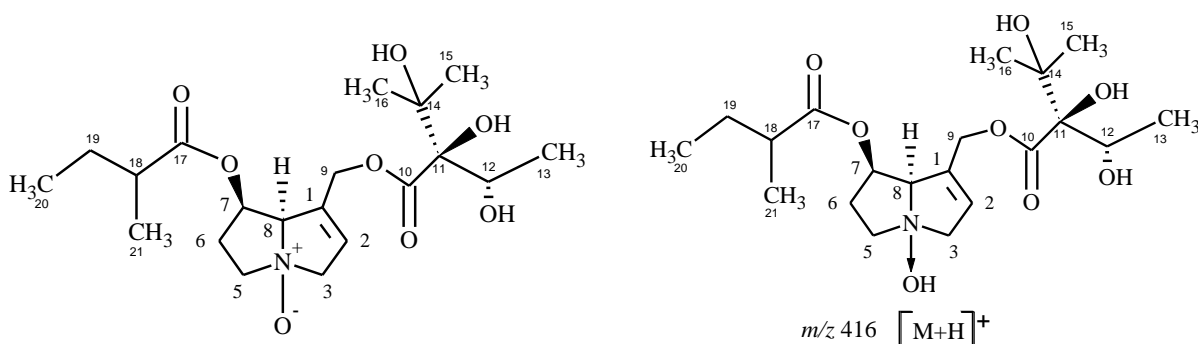


Figura 54. Estrutura química de *N*-óxido da 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina e da molécula protonada em m/z 416 $[M+H]^+$

Entre os alcaloides isolados e identificados, vale ressaltar que os mesmos tem sido isolados previamente no gênero *Echium*, com exceção do *N*-óxido da 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina (Ver tabela 6 e tabela 1). Equimidina tem sido identificada em oito das espécies de *Echium* descritos na tabela 1, enquanto que os alcaloides 9-angeloilretronecina, licopsamina, 7-acetil-licopsamina e equihumilina tem sido identificadas em mais de três espécies e podem ser utilizadas futuramente como marcadores químicos para o gênero, visto que algumas espécies vegetais do gênero *Echium* são morfologicamente semelhantes, gerando dificuldade para a identificação (ROMEIRAS *et al.*, 2008).

Tabela 9: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da literatura e da equimidina (**5**) e 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina (**6**)

	Equimidina*		5		6	
N ⁰	RMN ^{13}C	RMN ^1H	RMN ^{13}C	RMN ^1H	RMN ^{13}C	RMN ^1H
1	132,9	-	132,0	-	132,0	-
2	128,6	5,82; 1H; m	126,3	5,92; s	126,0	5,80; s
3	62,7	3,94; 1H; dm	60,5	3,68; m	61,4	3,07; m
		3,36; 1H; m		3,58; m		3,69; m
5	53,7	3,33; 1H; m	53,8	3,42; m	53,9	2,83;m
		2,65; 1H; m		2,87; m	-	3,33;m
6	34,5	2,08; 2H; m	32,6	2,02; m	34,1	2,05;m
7	73,7	5,41; 1H; m	72,1	5,33; m	73,6	5,32;d
8	76,0	4,39; 1H; m	73,4	4,48; m	76,1	5,30 ;s
9	62,5	4,88; 1H; dm	60,1	4,88; dm	60,8	5,02; d
		4,62; 1H; dm		4,69; dm		4,95; d
10	174,2	-	174,4	-	175,3	-
11	83,1	-	84,3	-	83,6	-
12	69,7	4,14; 1H; q	70,0	4,20; q	69,8	4,09 m ou q
13	18,5	1,22; 3H; d	18,5	1,26; d	18,4	1,22 d
14	73,6	-	72,0	-	72,2	-
15	24,7	1,19; 3H; s	24,8	1,23; s	24,8	1,27
16	26,0	1,26; 3H; s	26,2	1,29; s	26,1	1,18 s
17	166,9	-	165,7	-	174,3	-
18	127,4	-	123,3	-	40,9	2,37;m
19	139,3	6,06; 1H; qq	141,2	6,16; qq	16,5	1,82; m
20	15,7	1,93; 3H; quin	16,8	1,80; d	11,4	1,13; t
21	12,3	1,77; 3H; dq	12,0	1,78; s	26,6	1,93; s

* EL-SHAZLY *et al.*, 1996a; MEHRABANI *et al.*, 2006.

4.7.3 Triterpeno da *Echium hypertropicum*

A substância **9** isolada (ver item 3.6.1.3) apresentou banda de cor azul, típica de substâncias terpênicas, após a aplicação do revelador colorimétrico vanilina sulfúrica na análise por CCD, ilustrado na Figura 55. A substância **9** também foi analisada através de diferentes métodos espectroscópicos (CG-MS, RMN de ^1H e ^{13}C e uni e bidimensional).

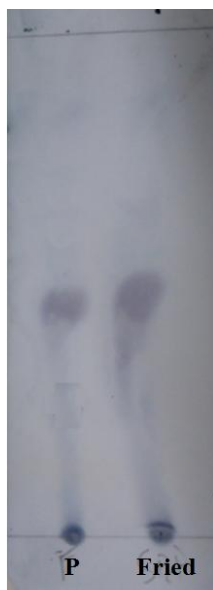


Figura 55. Cromatograma da substância **9** (Fried). P- padrão de friedelina. Sistema de eluente: hexano/acetato de etila (8:2); Revelador: vanilina sulfúrica; Fase estacionária: gel de sílica.

O cromatograma da substância **9** obtido por CG-MS apresentou com um sinal principal (Figura 56), cujos fragmentos foram característicos de substância triterpênica que estão descritos na Tabela 10 e ilustrados na Figura 57 (FELIU, 2011). O íon fragmento de m/z 426 foi identificado como sendo o íon molecular $[\text{M}]^+$ que foi atribuído à fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$, sugerindo seis equivalentes de deficiência de hidrogênio (IGOLI e GRAY, 2008), sendo proposto a presença de um dupla ligação e cinco anéis de seis membros, típicos de estrutura terpênica pentacíclica. O espectro de massas apresentou como pico base o íon fragmento de m/z 69. O íon fragmento de m/z 411 foi atribuído a perda de uma metila ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$) (SILVIA, 2007). A clivagem nos anéis A, B e D resultaram na formação dos íons fragmentos de m/z 341, 273 e 123, respectivamente. A cisão entre os carbonos C-13 e C-14 originou os fragmentos de m/z 218 e 191, enquanto que a quebra da ligação entre C-8 e C-14 no anel C forneceu o fragmento de m/z 205. Estes íons observados são característicos de

fragmentações de triterpenos pentacíclicos da série friedelano (SHIOJIMA *et al.*, 1992). Os fragmentos iônicos propostos para a substância **9** estão ilustrados na Figura 58.

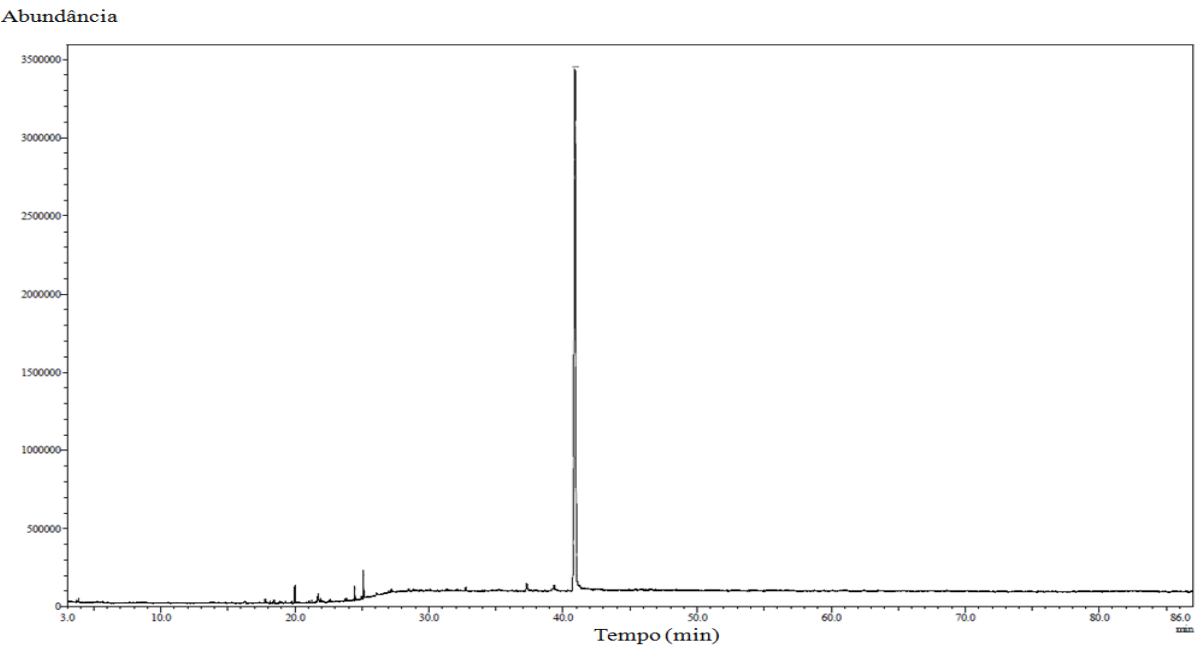


Figura 56. Cromatograma da substância **9** obtido no aparelho GCMS-QP5000.

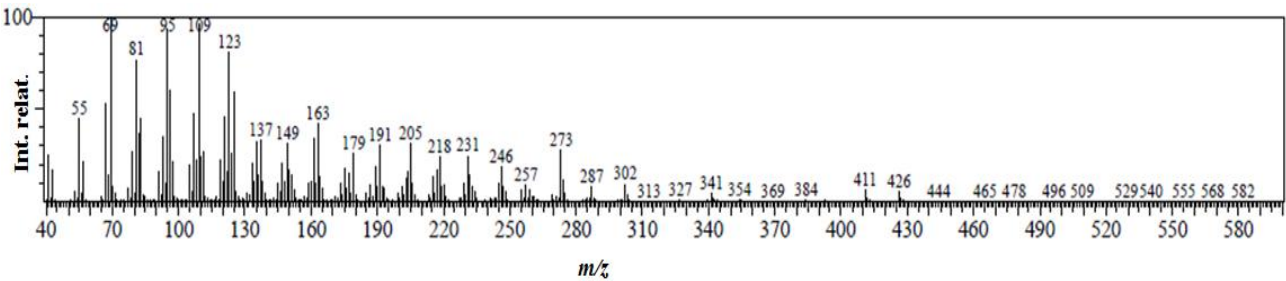


Figura 57. Espectro de massas da substância **9** obtido por ionização por impacto de elétrons.

Tabela 10: Triterpeno da *E. hypertropicum* obtido por GC-MS.

Triterpeno	[M ⁺]	íons característicos	m/z (abundância relativa)	*Ref
Friedelina	426	426 (6); 273(28); 246(19); 231(25); 218(24); 205(31); 191(31); 179(25); 163(43); 149(31); 137(34); 125(59); 123(81); 109(96); 95(93); 69(100); 55(45).		1

* ¹FELIU, 2011.

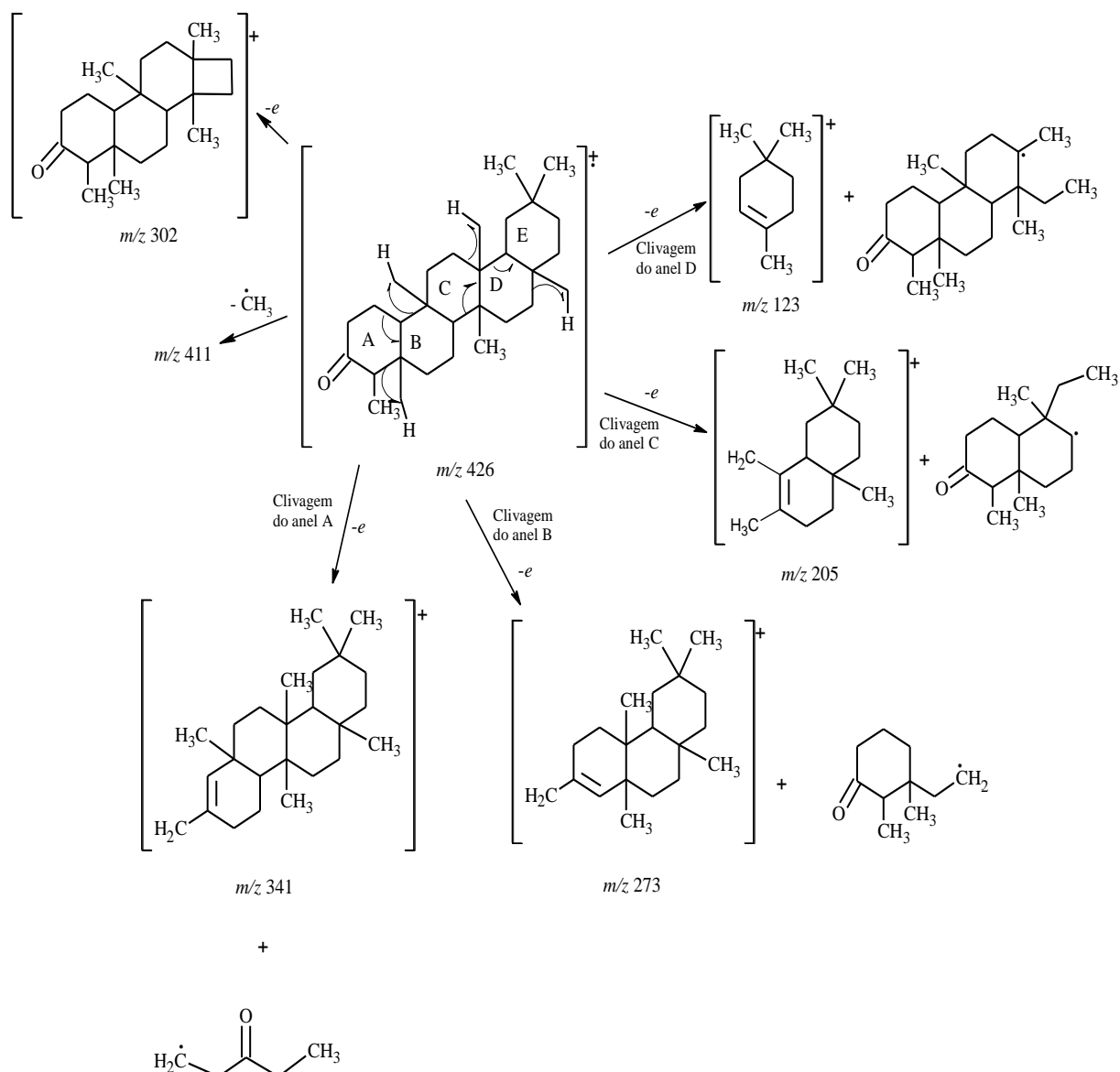


Figura 58. Estrutura proposto dos íons fragmentos da substância **9**.

Os espectros de RMN da substância **9** apresentaram valores de deslocamentos químicos semelhantes ao descrito na literatura para friedelina (SILVA, 2007; ABREU, 2009; ABREU *et al.*, 2011; MAGALHÃES, 2012). A Figura 59 apresenta o espectro de RMN de ^1H obtido para a substância **9**, no qual os sete singletos na região de δ (ppm) 1,26 a 0,7 (1,18; 1,05; 1,01; 1,00; 0,95; 0,87 e 0,72) indicaram a presença de sete grupos metila. O dubleto em δ_{H} 0,88 ($J = 5,0$ Hz) foi atribuído aos prótons metílicos ligado ao carbono C-23, característico de triterpenos da classe friedelano (ABREU *et al.*, 2011).

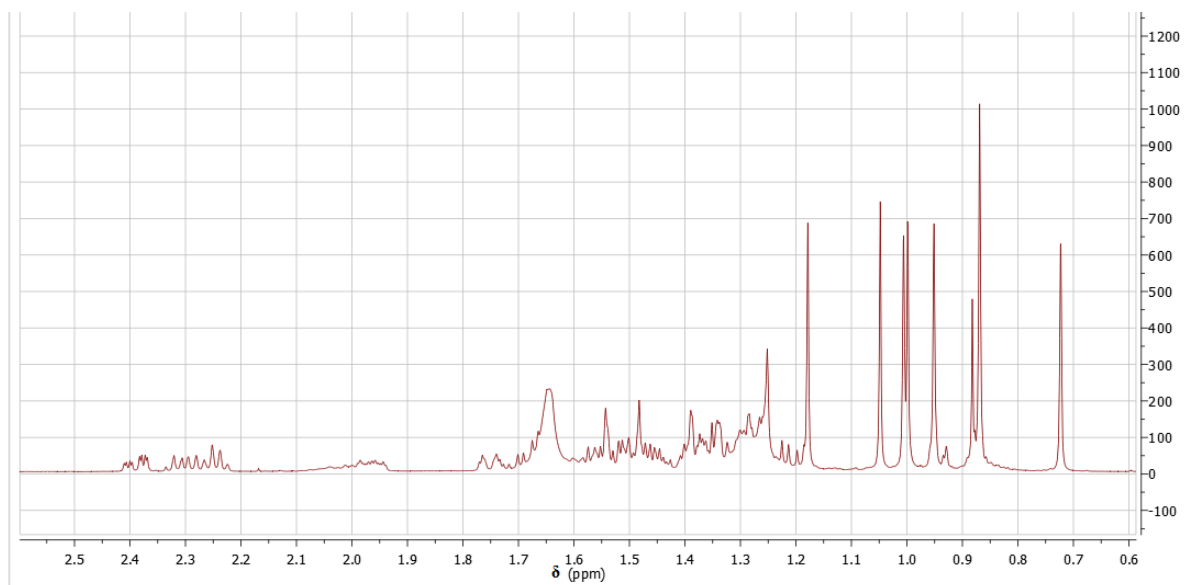


Figura 59. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **9**.

O espectro de APT da substância **9** (Figura 60 e tabela 11) apresentou dezoito sinais relativos a CH_2 e C e doze sinais referentes a CH_3 e CH. O sinal em 213,2 ppm foi atribuído à carbonila da cetona (C-3) (PAVIA, 2012), enquanto, os sinais em 14,7 (C-24) e 6,8 (C-23) foram correlacionados aos grupos metila da série friedelano (MAHATO e KUNDU, 1994). Um total de 30 carbonos foi assinalado no espectro, sendo oito metílicos, onze metilênicos, quatro metínicos e seis carbonos quaternários. A comparação do padrão de fragmentação de massas e os dados obtidos de RMN ^1H e ^{13}C com os descritos na literatura (SILVA, 2007; ABREU, 2009; ABREU *et al.*, 2011; MAGALHÃES, 2012) permitiu a identificação da substância **9** como friedelina (Figura 61).

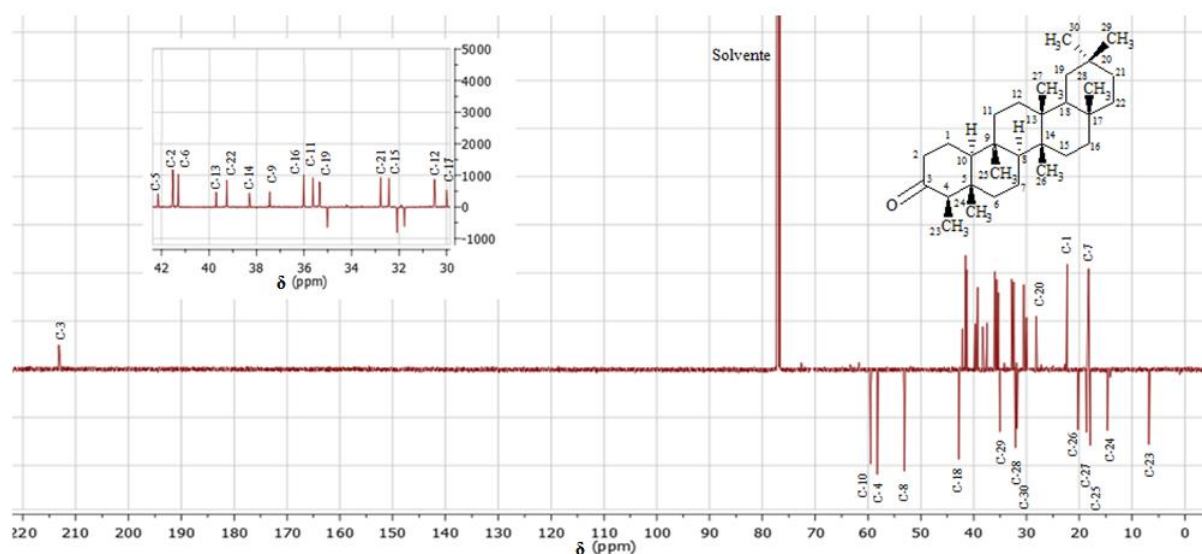


Figura 60. Espectro de RMN de ^{13}C APT (125 MHz, CDCl_3) da substância **9**. Sinais para cima (CH_2 e C), sinais para baixo (CH_3 e CH).

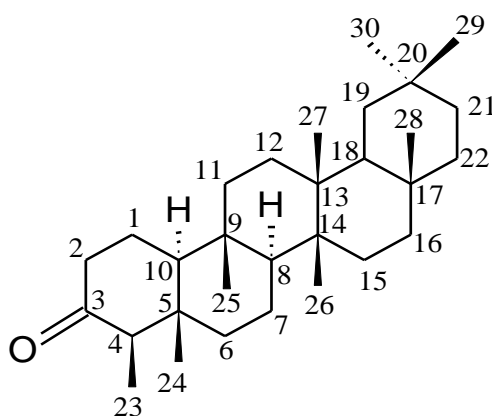


Figura 61. Estrutura química da friedelina.

Tabela 11: Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância **9** obtidos e descritos na literatura para friedelina*.

Carbono	δ_{C} subst. 9	APT	δ_{C} Lit.*	Carbono	δ_{C} subst. 9	APT	δ_{C} Lit.*
1	22,3	CH_2	22,3	16	36,0	CH_2	36,0
2	41,5	CH_2	41,6	17	30,0	C	30,0
3	213,2	C	213,1	18	42,8	CH	42,8
4	58,2	CH	58,2	19	35,3	CH_2	35,4
5	42,1	C	42,2	20	28,2	C	28,2
6	41,3	CH_2	41,3	21	32,9	CH_2	32,8
7	18,2	CH_2	18,3	22	39,3	CH_2	39,3
8	53,1	CH	53,1	23	6,8	CH_3	6,8
9	37,4	C	37,5	24	14,7	CH_3	14,7
10	59,5	CH	59,5	25	17,9	CH_3	17,96
11	35,6	CH_2	35,7	26	20,3	CH_3	20,3
12	30,5	CH_2	30,5	27	18,7	CH_3	18,7
13	39,7	C	39,7	28	32,1	CH_3	32,1
14	38,3	C	38,3	29	35,0	CH_3	35,0
15	32,4	CH_2	32,4	30	31,8	CH_3	31,8

*ABREU, 2009 (100 MHz, CDCl_3).

4.8 Atividades biológicas

4.8.1 Atividade antibacteriana

Teste susceptibilidade – Concentração Mínima Inibitória (CMI)

As duas espécies de *Echium* apresentaram resultados semelhantes na determinação do CMI com valor de 250 µg/mL frente à cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, ou seja, a concentração mínima inibitória dos extratos etanólicos das folhas de *E. hypertropicum* e *E. stenosphon* capaz de inibir o crescimento microbiano das cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 foi de 250 µg/mL. O alcaloide isolado, 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina também foi avaliado e apresentou o CMI igual a 25 µg/mL (Figura 62).

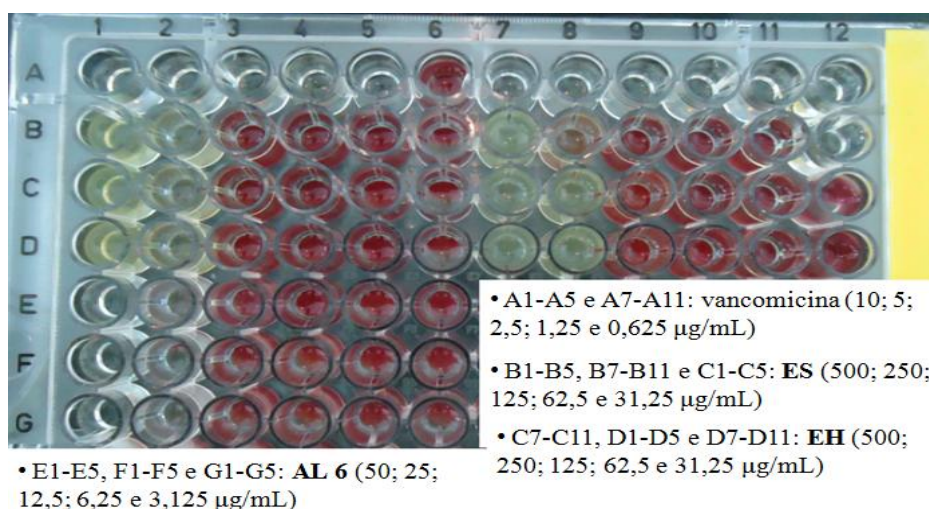


Figura 62. Microplaca do teste de susceptibilidade bacteriana com cepas de *S. aureus* ATCC 29213. ES- extrato etanólico de folhas de *E. stenosphon*; EH- extrato etanólico de folhas de *E. hypertropicum*; AL 6- alcaloide 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina.

A inibição do crescimento bacteriano apresentado pelos extratos etanólicos das duas espécies de *Echium* é coerente com o descrito por alguns autores para a família Boraginaceae. KLOUCEK e colaboradores (2007) relataram que o extrato de *Cordia alliodora* apresentou um CMI de 2 mg/mL frente a *S. aureus* ATCC 25923, 0,5 mg/mL contra *S. epidermidis*

ATCC 12228 e 1 mg/mL contra *Bacillus cereus* ATCC 11778. Estudos de ABOLHASSANI (2004, 2010) mostraram que extrato aquoso obtido de flores de *Echium amoenum* inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* 8327 de maneira dose dependentes (CMI de 6,2 mg/mL e halo de inibição média de 7,0 mm). Os alcaloides pirrolizidínicos também são descritos pela atividade, como por exemplo, os isolados de *Heliotropium subulatum* relatados como agentes antibacterianos frente às cepas de *S. aureus*, *S. pneumoniae* e *E. coli*, entre outras (SINGH *et al.*, 2002). Logo, a atividade antibacteriana observada para os extratos etanólicos das duas espécies de *Echium* avaliadas pode estar correlacionada com o potencial antibacteriano dos alcaloides pirrolizidínicos, identificados nas duas espécies estudadas.

4.8.2 Atividade anticolinesterásica – método quantitativo

A substância utilizada como padrão positivo (eserina), demonstrou uma grande atividade sobre o teste enzimático, inibindo mais de 90% das enzimas, na menor concentração testada (Figura 63). Já a inclinação da curva de ação anticolinesterásica para os extratos etanólicos não apresentou uma inclinação estatisticamente significativa, demonstrando que não há ação dos extratos sobre a atividade da enzima. A equimidina apresentou uma ação inibitória sobre a atividade da enzima, com a curva de inibição com desvio estatisticamente significativo do zero (p valor $< 0,005$). Embora, para a quantidade testada da enzima a equimidina não tenha inibido mais do que 25% da atividade inicial da enzima em relação ao ambiente aquoso, não foi possível determinar a concentração que inibe 50% da enzima (IC_{50}). A equimidina mostra-se, portanto, como um potencial agente para uso terapêutico, necessitando novos testes para a avaliação da toxicidade e eficiência.

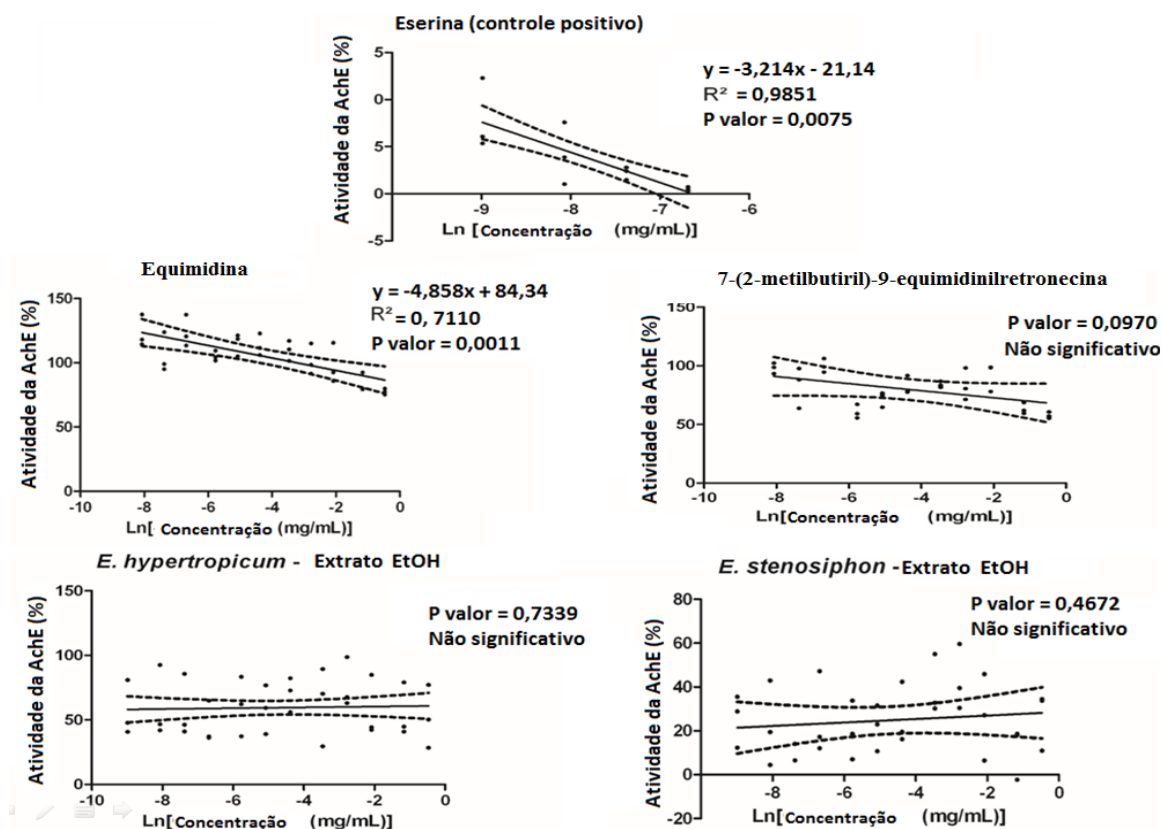


Figura 63. Regressão linear entre atividade da AChE (%) x logaritmo natural da concentração eficaz de eserina, equimidina, 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina, extrato etanólico de *E. hypertropicum* e *E. stenosphon*.

4.8.3 Atividade inseticida

Os teste realizados com os barbeiros (*Rhodnius prolixus*) apresentaram resultados negativos, pois não houve diferença entre os grupos tratados com o alcaloide isolado 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina e os grupos controles (sem tratamento), assim 100 % dos insetos chegaram a fase adulta sem alteração.

Outro inseto avaliado foi o *Dysdercus peruvianus* que é considerado uma praga economicamente importante na cultura do algodoeiro por causar prejuízos consideráveis, que se relacionam à perda de peso da semente, redução do teor de óleo, possíveis inoculação de microrganismos nas sementes e, por fim, causar manchas nas fibras do algodão e, o seu controle será fundamental para melhorar a qualidade do produto (STANISÇUASKI *et al.*, 2005). No caso de *Dysdercus peruvianus*, pela comparação dos gráficos do grupo tratado com a amostra (Figura 64) e com os grupos controles (Figuras 65 e 66), foi observado que a percentagem de mortes não foi significativa, mas, alguns insetos do grupo tratado com o alcaloide 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina tiveram um retardo no crescimento e, portanto, não chegaram à fase adulta, durante os 11 dias do período de teste. Após o 11º dia, todos os insetos chegaram à fase adulta e o teste foi suspenso.

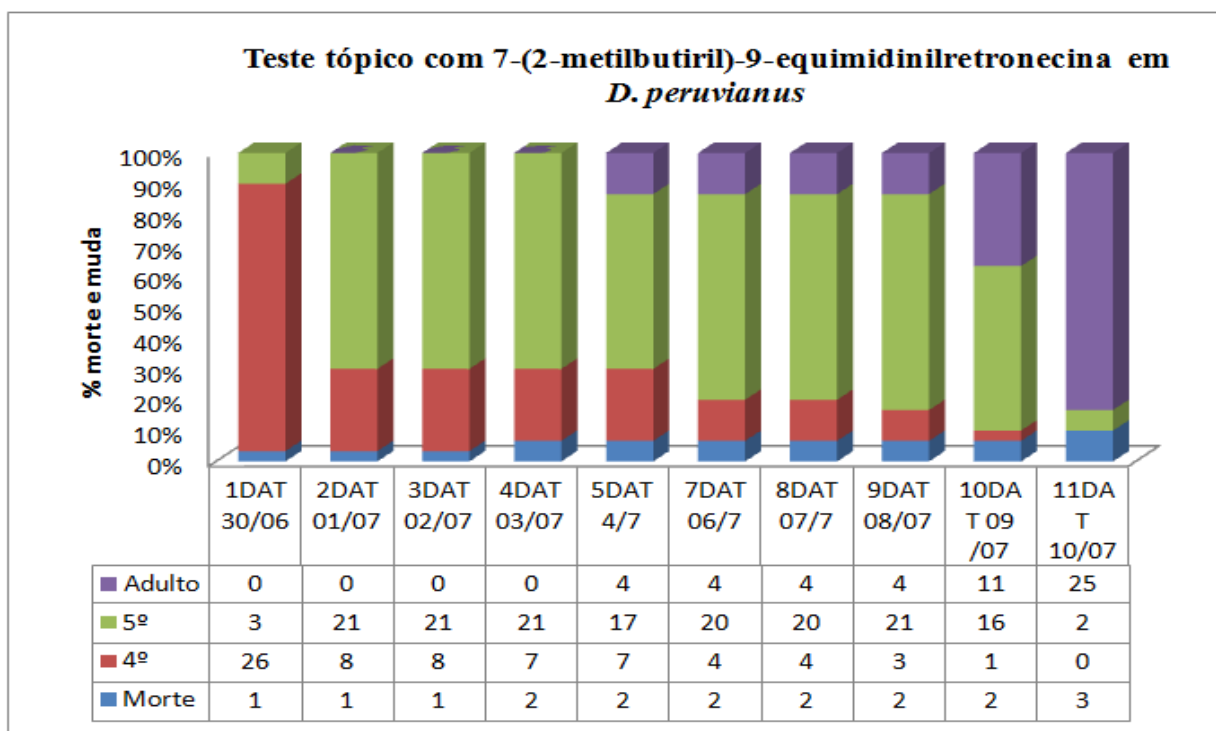


Figura 64. Percentual (%) de mortalidade e ecdise em *D. peruvianus* tratados com 1 µL/inseto do alcaloide na concentração de 1 mg/mL.

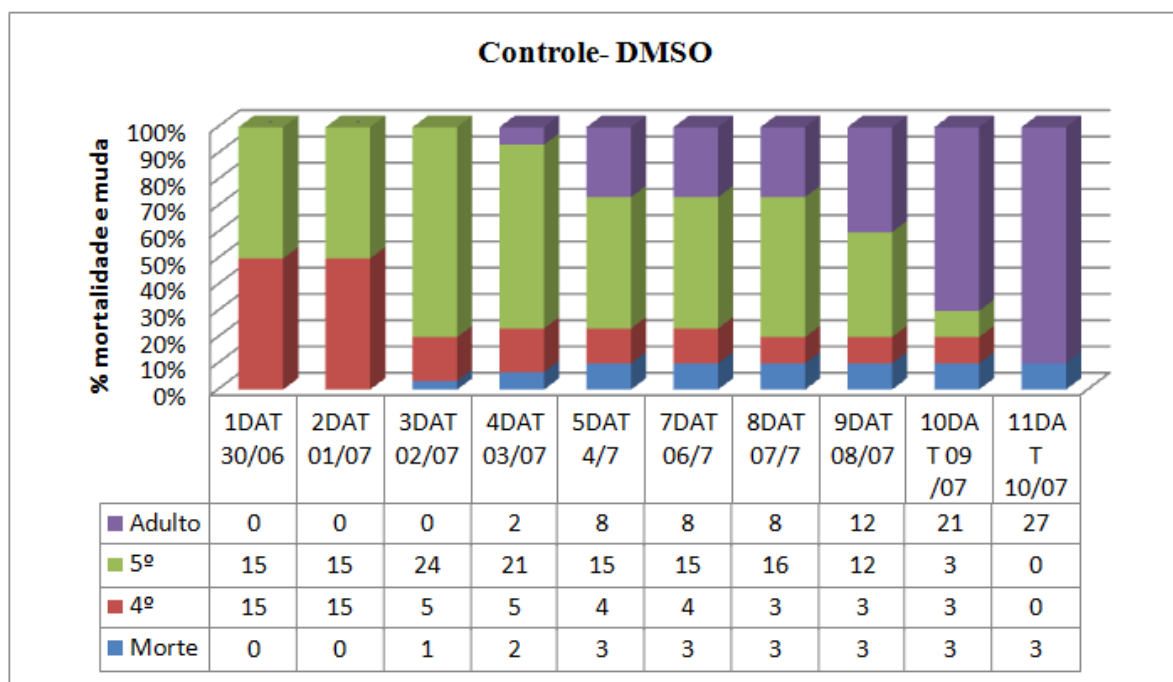


Figura 65. Percentual (%) de mortalidade e ecdise em *D. peruvianus* tratados com 1 µL de DMSO.

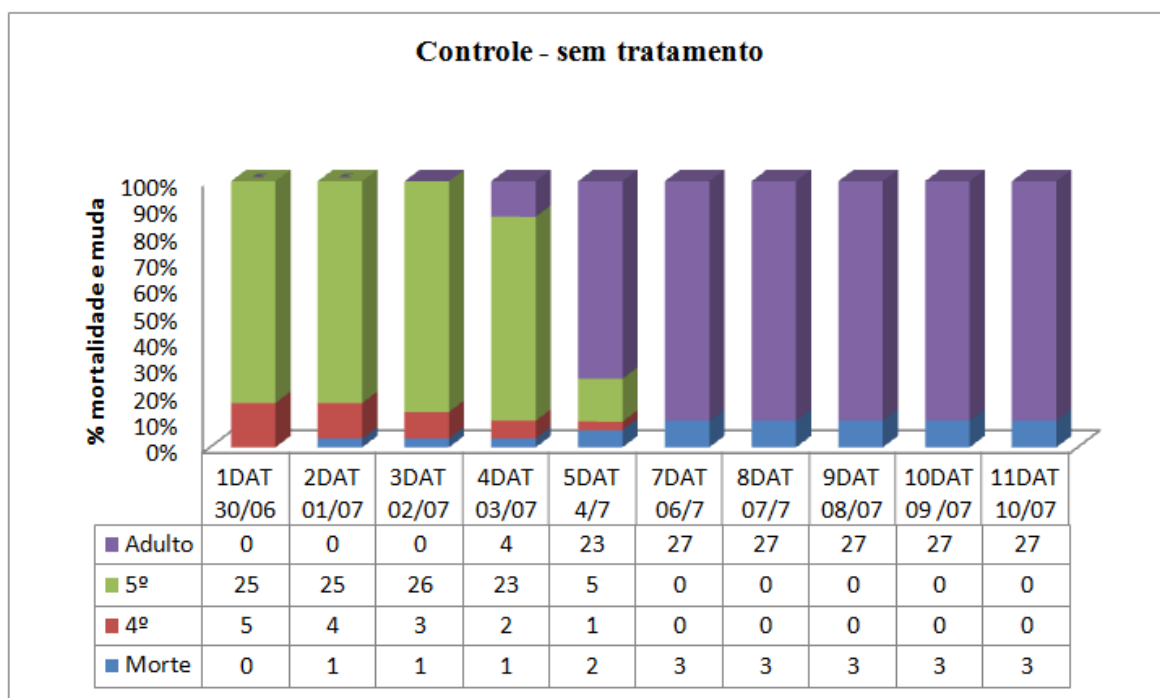


Figura 66. Percentual (%) de mortalidade e ecdise em *D. peruvianus* sem tratamento.

4.8.4 Atividade antiviral

A toxicidade dos extratos etanólicos das folhas de *E. hypertropicum* e *E. stenosiphon subsp. stenosiphon* foi avaliada através da avaliação da alteração da morfologia das células Vero, determinando-se a concentração máxima não tóxica (CMNT) e a concentração citotóxica para 50% das culturas de células (CC₅₀) que é um parâmetro que determina a viabilidade das mesmas através da captação do vermelho neutro.

A prévia avaliação da citotoxicidade é importante para evitar a obtenção de resultado falso positivo de uma lesão por herpes vírus. Os resultados estão listados na tabela 12. Verificou-se que os extratos etanólicos de ambas as espécies apresentaram uma CMNT de 3,9 µg/mL. Os valores de CC₅₀ obtidos foram de 140,10 µg/mL e 96,86 µg/mL para *E. hypertropicum* e *E. stenosiphon subsp. stenosiphon*, respectivamente.

Após a determinação da citotoxicidade, foi realizada a triagem da atividade antiviral frente aos herpesvírus, e verificou-se que o extrato etanólico de *E. hypertropicum* apresentou uma percentagem de inibição (PI) de 27,5% contra HSV-1S e 43,8% contra HSV-2S, enquanto o extrato etanólico de *E. stenosiphon subsp. stenosiphon* não apresentou atividade contra os vírus na concentração de 3,9 µg/mL.

Tabela 12. Resultados da análise do teste de atividade antiviral dos extratos etanólicos de folhas de *E. hypertropicum* e *E. stenosiphon subsp. stenosiphon* contra HSV-1S e HSV-2S.

Amostra	CMNT (µg/mL)	CC ₅₀ (µg/mL)	HSV-1S PI	HSV-2S PI
EH	3,90	140,10	27,5%	43,8%
ES	3,90	96,86	0	0

CMNT- Concentração Máxima Não Tóxica; CC₅₀- Concentração tóxica para 50% das células em cultura; PI- Percentagem de Inibição; EH- Extrato etanólico de *E.hypertropicum*; ES- Extrato etanólico de *E. stenosiphon subsp. stenosiphon*.

O valor de ED₅₀ não foi calculado devido à baixa percentagem de inibição apresentada pelos extratos na concentração de 3,9 µg/mL. Os valores de CMNT e CC₅₀ mostraram que as amostras testadas apresentaram toxicidade frente às células Vero nas concentrações testadas. Tendo em vista o exemplo do trabalho de FALCÃO (2007) que testou o extrato etanólico de flores de *Calceolaria chelidonioides* contra os mesmos vírus, nas mesmas condições de

análises, encontrando uma CMNT de 200,0 µg/mL e uma CC₅₀ maior que 200 µg/mL, podemos verificar que os extratos analisados de *Echium* apresentaram maior citotoxicidade. É sugerido que esta toxidade esteja relacionada aos alcaloides pirrolizidínicos presentes nas duas espécies testadas, pois são descritos na literatura como citotóxicos e carcinogênicos (FU *et al.*, 2002; MEHRABANI *et al.*, 2006; MATTSSON, 2007; ZAMANSOLTANI *et al.*, 2008, WIEDENFELD e EDGAR, 2011).

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho relata o primeiro estudo da composição química e atividade biológica das folhas de *E. hypertropicum* e *E. stenosphon subsp. stenosphon*, endêmicas das ilhas de Cabo Verde. Os métodos cromatográficos e as técnicas espectroscópicas utilizadas permitiram a identificação de 10 alcaloides pirrolizidínicos, sendo duas em ambas as espécies, um triterpeno e 22 componentes do óleo essencial, ilustrados na Figura 67 e Figura 68. Este trabalho foi também a primeira contribuição sobre a composição química do óleo essencial obtido das flores de *E. hypertropicum*.

Os chás obtidos das duas espécies de *Echium* obtidos pelo método de decocção apresentaram resultados positivos para a presença de alcaloides. Desta forma, se faz necessário estudo para a identificação do tipo de alcaloide presente, visto que os alcaloides pirrolizidínicos foram identificados nas duas espécies de *Echium* estudadas e são considerados como substâncias tóxicas. Portanto, faz-se necessário a avaliação da toxicidade destas espécies de *Echium* utilizadas na medicina popular, visando o uso seguro pela população.

Os extratos etanólicos das duas espécies de *Echium* e o alcaloide 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina apresentam potencial antibacteriano ao inibir o crescimento *S. aureus*.

A avaliação da atividade inseticida do alcaloide 7-(2-metilbutiril)-9-equimidinilretronecina contra a praga do algodão (*Dysdercus peruvianus*) mostrou que esta substância impediu que apenas alguns insetos chegassem à fase adulta. Embora a percentagem de mortes dos insetos não seja significativa, a pesquisa desta atividade frente a outros insetos pode ser futuramente avaliada.

A equimidina apresentou atividade anticolinesterásica. Embora não tenha inibido mais de 25% da atividade inicial da enzima em relação ao ambiente aquoso, a equimidina mostra-se como um potencial agente para uso terapêutico, necessitando novos testes de avaliação da toxicidade e eficiência.

A avaliação da atividade antiviral mostrou que os extratos etanólicos *E. hypertropicum* e *E. stenosphon* apresentaram toxicidade frente à linhagem de célula testada. Esta toxicidade pode estar correlacionada com a presença dos alcaloides pirrolizidínicos, descritos na literatura como substâncias tóxicas.

Os APs isolados como equimidina, 9-angeloilretronecina, licopsamina e 7-acetil-licopsamina por terem sido identificados em várias espécies de *Echium*, podem ser utilizados

no futuro como marcadores quimiotaxonômicos do gênero e marcadores químicos para o controle de qualidade destas plantas medicinais.

O presente trabalho de estudo fitoquímico e a avaliação das atividades biológicas *in vitro* das espécies caboverdianas *Echium hypertropicum* e *Echium stenosphon* subsp. *stenosphon*, contribui para o conhecimento de diversos constituintes químicos e usos medicinais de espécies endêmicas caboverdianas, praticamente desprovidas de estudos científicos. Desta forma, agregam valor a estas espécies, pertencentes à flora dos Parques Naturais de Serra Malagueta e Monte Gordo em Cabo Verde.

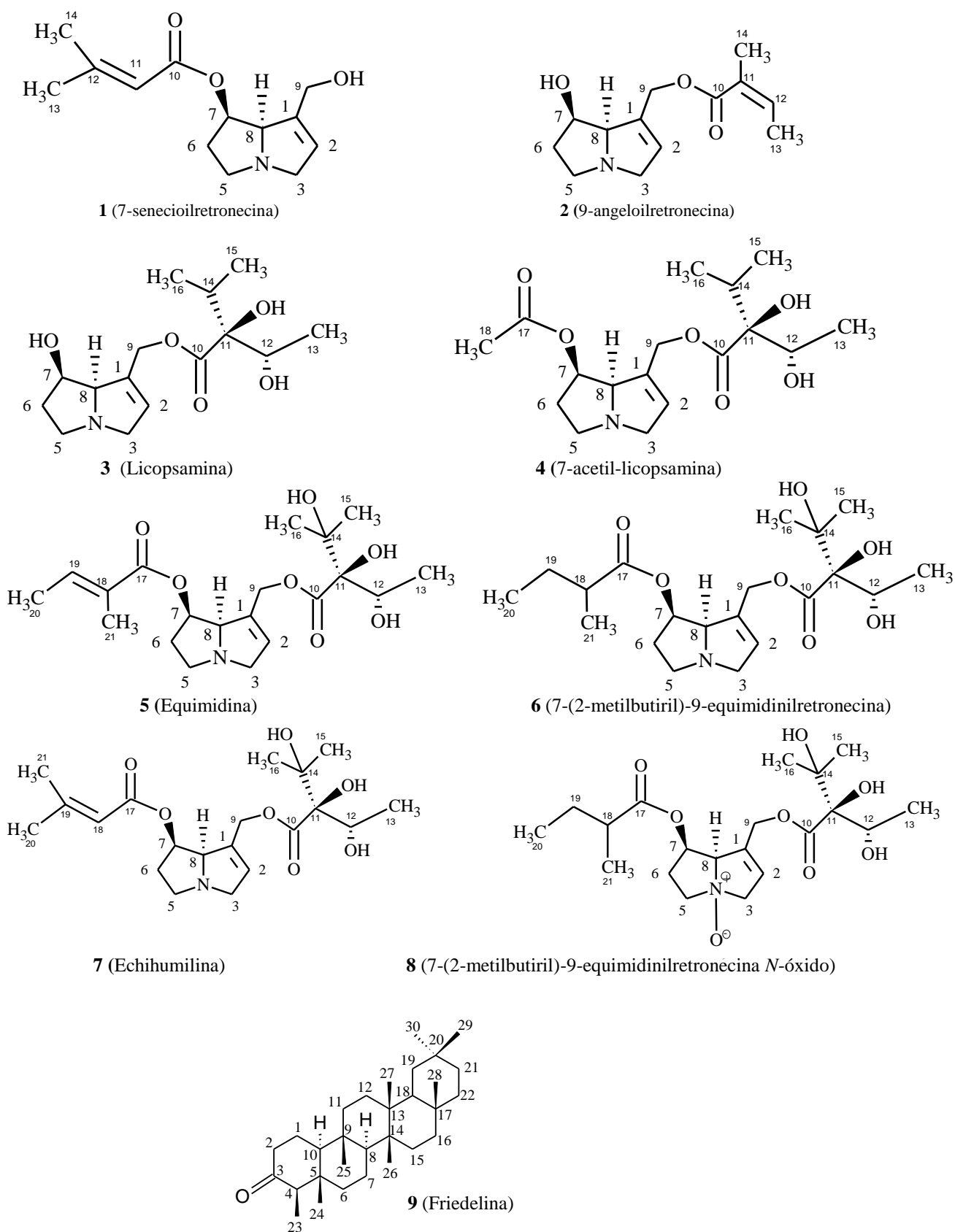


Figura 67. Substâncias identificadas em *E. hypertropicum* e *E. stenosphom*.

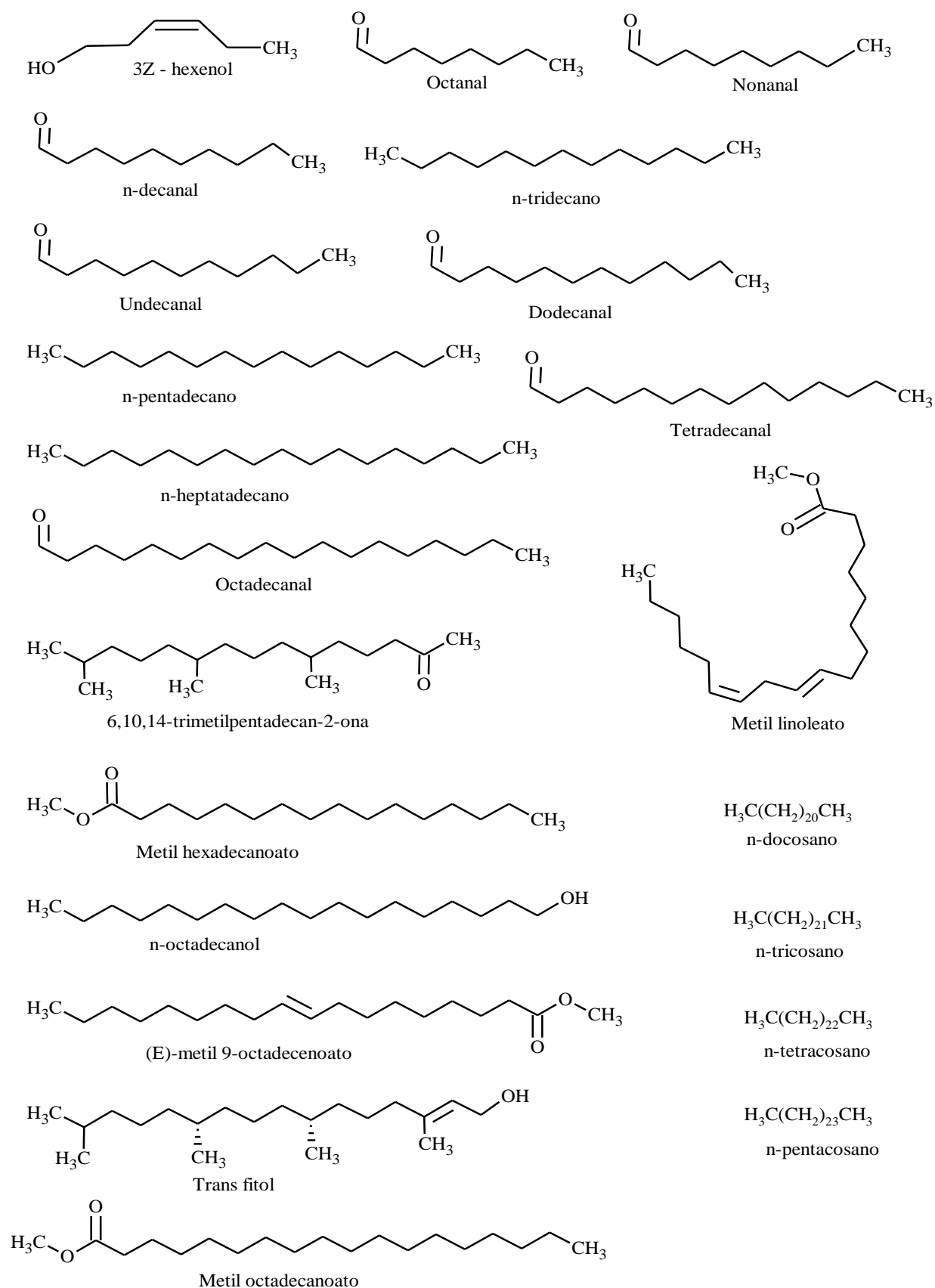


Figura 68. Estruturas dos componentes do óleo essencial das flores de *E. hypertropicum*.

6 REFERÊNCIAS

- ABOLHASSANI, M. Antibacterial Effect of Borage (*Echium amoenum*) on *Staphylococcus aureus*. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 8, 382-385, 2004.
- ABOLHASSANI, M. Antiviral activity of borage (*Echium amoenum*). Archives of Medical Science, 6 (3), 366-369, 2010.
- ABRANTES, J.L. Estudo da atividade anti-HSV-1 de terpenos isolados de algas pardas marinhas. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia), Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, 2006.
- ABREU, V.G.C. estudo fitoquímico e biológico das folhas, caule e flores de *Lychnophora pinaster* Mart. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.
- ABREU, V.G.C., TAKAHASHI, J.A., DUARTE, L.P., PILÓ-VELOSO, D., JUNIOR, P.A.S., ALVES, R.O., ROMANHA, A.J., ALCÂNTARA, A.F.C. Evaluation of the bactericidal and trypanocidal activities of triterpenes isolated from the leaves, stems, and flowers of *Lychnophora pinaster*. Revista Brazilian Journal of Pharmacognosy, 21 (4), 615-621, 2011.
- ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th edition, Allured Publishing, Carol Stream, 2007.
- ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, 1995.
- AGRA, M.F, FREITAS P.F, BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 17 (1), 114-140, 2007.
- AGRA, M.F, SILVA, K.N, BASÍLIO, I.J.L.D, FRANÇA, P.F, BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. Revista Brasileira de Farmacognosia, 18, 472-508, 2008.
- AGUIAR, C. Botânica para Ciências Agrárias e do Ambiente. Sistemática. Instituto Politécnico de Bragança, Vol. III p.81, 2012.
- AHMAD, I., AQIL, F., OWAIS, M. Modern Phytomedicine. Turning Medicinal Plants into Drugs. Ed. Wiley – Vch, 2006.
- ALALI, F.Q., TAHBOUB, Y.R., IBRAHIM, E.S., QANDIL, A.M., TAWAHA, B.K.P., SY, A., NAKANISHI, Y., KROLL, D.J., OBERLIE, N.H. Pyrrolizidine alkaloids from *Echium glomeratum* (Boraginaceae). Phytochemistry 69, 2341-2346, 2008.
- AMIRGHOFRA, Z., AZADBAKHT, M., KESHAVARZI, F. *Echium amoenum* stimulate of lymphocyte proliferation and inhibit of humoral antibody synthesis. Iranian Journal Medical Science, 25, 119-124, 2000.

ANVISA. Resolução RE nº 89 de 16 de Março de 2004. Determina a publicação da lista de registro simplificado de fitoterápicos. Relator: Davi Rumel. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 2004.

BAH, M., PEREDA-MIRANDA, R. Alcaloides pirrolizidínicos. In:_____. FARMACOGNOSIA: da planta ao medicamento, 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, Cap. 32, 847-867, 2004.

BEAULIEU, J.C. & GRIMM, C.C. Identification of volatile compounds in cantaloupe at various developmental stages using solid phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1345-1352, 2001.

BEGA, J.E. The poisonous substances (pyrrolizidine alkaloids, PAs) found in fireweed, 2008. http://fireweed.org.au/uploads/media/Fireweed_presentation.pdf acessado em 21/10/2012.

BLENNOW, K., de LEON, M.J., ZETTERBERG, H. Alzheimer's disease. *The Lancet*, 368, 9553, 387-403, 2006.

BOATRIGT, W.L., & CRUM, A.D. Nonpolar-volatile lipids from soy protein isolates and hexane-defatted flakes. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74, 461-467, 1997.

BOPPRÉ, M., COLEGATE, S.M, EDGAR, J.A. Pyrrolizidine Alkaloids of *Echium vulgare* Honey Found in Pure Pollen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 594-600, 2005.

CARVALHO, M.L.S., ARAÚJO, S.I. Terceiro Relatório Nacional sobre a Biodiversidade em Cabo Verde. Ministério do Ambiente e da Agricultura, DGA, 2006.

CARVALHO, P.E.R. Louro Pardo. *Boletim de Pesquisa Florestal*, Colombo, 17, 63-66, 1988.

CHWIL, M., WERYSZKO-CHMIELEWSKA, E. Nectar production and pollen yield of *Echium vulgare* L. in the climatic conditions of Lublin. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*, 10 (3), 187-196, 2011.

CLSI- Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts approved standard. 2nd ed. NCCLS documents M27-A3. NCCLS, Wayne, PA, 2008.

COLEGATE, S.M., EDGAR, J.A., KNILL, A.M., LEE, S.T. Solid-phase Extraction and HPLC-MS Profiling of Pyrrolizidine Alkaloids and their N-oxides: a Case Study of *Echium plantagineum*. *Phytochemical Analysis*, 16, 108-119, 2005.

COSTA, R.S. Estudos de Pré-Formulação e Formulação de *Heliotropium indicum* (L.) DC (*Boraginaceae*). Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2010.

CREWS, C., BERTHILLER, F., KRSKA, R. Update on analytical methods for toxic pyrrolizidine alkaloids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 327-338, 2010.

CULVENOR, C.C.J. The alkaloids of *Echium plantagineum*. *Australian Journal of Chemistry*, 9, 512-520, 1956. Abstract via CAS; 51:9642f.

CULVENOR, C.C.J., EDGAR, J.A., JAGO, M.V., OUTERIDGE, A., PETERSON, J.E., SMITH, L.W. Hepato- and pneumotoxicity of pyrrolizidine alkaloids and derivatives in relation to molecular structure. *Chemico-Biological Interactions*, 12, 299-324, 1976.

CULVENOR, C.C.J., EDGAR, J.A., SMITH, L.W. Pyrrolizidine alkaloids in honey from *Echium plantagineum* L. *Journal of Agriculture Food and Chemistry*, 29, 958-960, 1981.

CULVENOR, C.C.J., EDGAR, J.A., SMITH, L.W., TWEEDDALE, H.J. Dihydropyrrolizines. III. Preparation and reactions of derivatives related to pyrrolizidine alkaloids. *Australian Journal of Chemistry*, 23, 1853-1867, 1970.

DE CLERCQ, E., DESCHAMPS, J., VERHELST, G., WALKER, R.T., JONES, A.S., TORRENCE, P.F., SHUGAR, D. Comparative efficacy of antiherpes drugs against different strains of herpes simplex virus. *Journal of Infectious Diseases*, 141, 563-574, 1980.

DEWICK, P.M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. Second Edition. John Wiley & Sons. Ltd, 2002.

DOMÍNGUEZ, D. M., REINA, M., SANTOS-GUERRA, A., SANTANA, O., AGULLÓ, T., LÓPEZ-BALBOA, C., GONZALEZ-COLOMA, A. Pyrrolizidine alkaloids from Canarian endemic plants and their biological effects. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36, 153-166, 2008.

DONGRÉ, A.R., JONES, J.L., SOMOGYI, A., WYSOCKI, V.H. Influence of peptide composition, gas-phase basicity and chemical modification on fragmentation efficiency: evidence for the mobile proton model. *Journal of the American Chemical Society*, 118, 8365-8374, 1996.

DUTTA, S.K., UTPAL, S., CHAKRABORTI, S.K. A modified method of isolation of indicine N-oxide from *Heliotropium indicum* and its antitumor activity against Ehrlich ascites carcinoma and sarcoma 180. *Indian Journal of Cancer Chemotherapy*, 9 (2), 73-7, 273-7, 1987.

EL-SHAZLY, A., ABDOL-ALL, M., TEI, A., WINK, M. Pyrrolizidine alkaloids from *Echium rauwolfii* and *Echium horridum* (Boraginaceae). *Zeitschrift fur Naturforschung C*, 54 (5-6), 295-300, 1999.

EL-SHAZLY, A., SARG, T., ATEYA, A., AZIZ, A. A., EL-DAHMY, S. Pyrrolizidine Alkaloids from *Echium setosum* and *Echium vulgare*. *Journal of Natural Products*, 59, 310-313, 1996a.

EL-SHAZLY, A., SARG, T., ATEYA, A., AZIZ, A. A., EL-DAHMY, S., WITTE, L., WINK, M. Pyrrolizidine and Tetrahydroisoquinoline alkaloids from *Echium humile*. *Phytochemistry*, 42 (1), 225-230, 1996b.

ELVIN-LEWIS, M. Should we be concerned about herbal remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 75, 141-164, 2001.

EVANS, W.C. Trease and Evans' pharmacognosy. 16th ed., Edinburg, London, New York, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto, Elsevier- Saunders (W.B.) Co. Ltd., 603 p. 2009.

FALCÃO, D.Q. Estudo da composição química de *Calceolaria chelidonioides* Humb. Bonpl. & Kunth.: da etnofarmacologia à elaboração de formulações galênicas tópicas contra Herpes simplex. Tese (Doutorado). Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

FELIU, D.A. Análise de terpenoides de espécies de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Mull. Arg) Pax (Euphorbiaceae). Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica, 2011.

FERNANDES, C.M.B. Flora Exótica de Cabo Verde: avaliação e impactos nos ecossistemas naturais, utilizando sistemas de informação geográfica. Dissertação (Mestrado em Biologia da Conservação). Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Animal, 2008.

FERNANDES, C.P., XAVIER, A., PACHECO, J.P.F., SANTOS, M.G., MEXAS, R., RATCLIFFE, N.A., GONZALEZ, M., S., MELLO, C.B., ROCHA, L., FEDER, D. Laboratory evaluation of the effects of *Manilkara subsericea* (Mart.) Dubard extracts and triterpenes on the development of *Dysdercus peruvianus* and *Oncopeltus fasciatus*. Society of Chemical Industry, 2012. Published online in Wiley Online Library (DOI 10.1002/ps.3388).

FERREIRA, A.A., OLIVEIRA, P.M., EVANGELISTA, E.A., ALVES, R.B., PIZZIOLO, V.R., BRASILEIRO, B.G., RODRIGUES, F.M.O., SILVEIRA, D., RASLAN, D.S. Atividades biológicas das partes aéreas de *Ipomoea cairica* (Convolvulaceae). Revista Brasileira de Plantas Medicinais, 8 (2), 14-18, 2006.

FOGLIO, M. A., QUEIROGA, C.L., SOUSA, I.M.O., FERREIRA, R. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos. Divisão de Fitoquímica, CPQBA/UNICAMP. Multiciência, 7, 2006.

FRANÇA, H.S. Análises morfoanatômica, química e atividades biológicas de *Myrsine rubra* M.F. Freitas & L.S. Kinoshita. Tese (Doutorado), UFRJ/NPPN/Programa de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais, 2010.

FREITAS, H.P.S. Estudo químico e farmacológico de *Cordia Polycephala* (Lam.) I. M. Johnston (Boraginaceae). Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química, UFC, 2010.

FU, P.P., XIA, Q., LIN, G., CHOU, M.W. Pyrrolizidine Alkaloids - Genotoxicity, Metabolism Enzymes, Metabolic Activation, and Mechanisms. Drug Metabolism Reviews, 36 (1), 1-55, 2004.

FU, P.P., YANG, Y., XIA, Q., CHOU, M.W., CUI, Y.Y., LIN, G. Pyrrolizidine Alkaloids – Tumorigenic Components in Chinese Herbal Medicines and Dietary supplements. Journal of Food and Drug Analysis, 10 (4), 198-211, 2002.

GHASSEMI, N., SAJJADI, S.E., GHANNADI, A., ARDAKANI, M.S., MEHRABANI M. Volatile constituents of a medicinal plant of Iran, *Echium amoenum* Fisch. and C.A. Mey. Daru volume 11, 1, 2003.

GHOLAMZADEH, S., ZARE, S., ILKHANIPOOR, M. Evaluation of the anxiolytic effect of *Echium amoenum* petals extract, during chronic treatment in rat. *Pharmaceutical Sciences*, 2 (2), 91-95, 2007.

GIBBS, P.E. Taxonomic studies on the genus *Echium* L. An outline revision of the Spanish species. *Lagascalia*, 1, 27-82, 1971.

GOMES, A.R., VASCONCELOS, T., ALMEIDA, M.H.G. Plantas na Medicina Tradicional de Cabo verde. Workshop Plantas Medicinais e Fitoterapêuticas nos Trópicos. IICT /CCCM, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. 1-13, 2008.

GOMES, I., GOMES, S., VERA-CRUZ, M.T., KILIAN, N., LEYENS, T., LOBIN, W. *Plantas endémicas e árvores indígenas de Cabo Verde*. Instituto Nacional de Investigação e Desenvolvimento Agrário. e Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH - Cooperação Técnica Alemã. República de Cabo Verde, 2003.

GONZALEZ, C.A., SANZ, J.M., MARCOS, G. Borage consumption as a possible gastric cancer protective factor. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2 (2), 157-8, 1993.

GROSSBERG, G.T. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on. *Current Therapeutic Research*, 64 (4), 216-35, 2003.

GUIL-GUERRERO, J. L., LÓPEZ-MARTÍNEZ, J. C., NAVARRO-JUÁREZ, R., GÓMEZ-MERCADO, F. Gamma-linolenic acid from Cape Verdian Boraginaceae. *Natural Product Research*, 20 (1), 9-12, 2006.

HARTMANN, A., SCHUMACHER, M., PLAPPERT-HELBIG, U., LOWE, P., SUTER, W., MUELLER, L. Use of the alkaline in vivo comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis*, 19, 51-59, 2004a.

HARTMANN, T., THEURING, C., BEUERLE, T., BERNAYS, E.A. Phenological Fate of Plant-Acquired Pyrrolizidine Alkaloids in the Polyphagous Arctiid *Estigmene acrea*. *Chemoecology*, 14, 207-216, 2004b.

HEIDARI, M.R., AZAD, E.M., MEHRABANI, M. Evaluation of the analgesic effect of *Echium amoenum* Fisch & C.A. Mey. extract in mice: Possible mechanism involved. *Journal of Ethnopharmacology* 103, 345-349, 2006a.

HEIDARI, M.R., MANDEGARY, A., HOSSEINI, A., VAHEDIAN, M. Anticonvulsant effect of methanolic extract of *Echium moenum* Fisch & C.A.Mey against seizure induced by picrotoxin in mice. *Pakistan Journal Biology Science*, 9, 772-776, 2006b.

HOL, W.H.G., VAN VEEN, J. A. Pyrrolizidine alkaloids from *senecio jacobaea* affect fungal growth. *Journal of Chemical Ecology*, 28, 9, 2002.

HOOPER, P.T. Pyrrolizidine alkaloid poisoning - pathology with particular reference to differences in animal and plant species. In *Effects of Poisonous Plants on Livestock (ISOPP1)*, Keeler, R.F., Van Kampen K. R., James, L.F. (eds). Academic Press, New York, 161-76, 1978.

HOSSEINI, N., ABOLHASSANI, M. Immunomodulatory Properties of Borage (*Echium amoenum*) on BALB/c Mice Infected with *Leishmania major*. Journal of Clinical Immunology, 31, 465-471, 2011.

IBRAHIM, E.S. Isolation and characterization of pyrrolizidine alkaloids from *Echium glomeratum* Poir (Boraginaceae). Thesis (M.Sc. in Applied Chemistry). Faculty of Graduate Studies, Jordan University of Science and Technology, 2007.

IGOLI, O.J., GRAY, I.A. Friedelanone and other triterpenoids from *Hymenocardia acida*. International Journal of Physical Sciences, 3 (6), 156-158, 2008.

IPCS - International Programme on Chemical Safety .Pyrrolizidine alkaloids health and safety guide. Health and safety guide no. 26. WHO, Geneva, 1989. Disponível em <http://www.inchem.org/documents/hsg/hsg/hsg026.htm>.

IPCS - International Programme on Chemical Safety. Pyrrolizidine alkaloids. Environmental health criteria 80. WHO, Geneva, 1988. Disponível em <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc080.htm>.

JOOSTEN, L., VAN VEEN, J. A. Defensive properties of pyrrolizidine alkaloids against microorganisms. Phytochemistry Reviews, 10, 127-136, 2011.

KARIOTI, A., SKAL TSA, H., DEMETZOS, C., PERDETZOGLOU, D., ECONOMAKIS, C.D., SALEM, A.B.. Effect of nitrogen concentration of the nutrient solution on the volatile constituents of leaves of *Salvia fruticosa* Mill. in solution culture. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 6505-6508, 2003.

KATO, A., KANO, E., ADACHI, I., MOLYNEUX, R.J., WATSON, A.A., R, NASH. J., FLEET, G.W.J., WORMALD, M.R., KIZU, H., IKEDA, K., ASANO, N. Australine and related alkaloids: easy structural confirmation by ¹³C NMR spectral data and biological activities. Tetrahedron: Asymmetry, 14, 325-331, 2003.

KATO, A., KATO, N., ADACHI, I., HOLLINSHEAD, J., FLEET, G.W. J., KURIYAMA, C., IKEDA, K., ASANO, N., NASH, R. J. Isolation of Glycosidase-Inhibiting Hyacinthacines and Related Alkaloids from *Scilla socialis*. Journal of Natural Products, 70, 993-997, 2007.

KLOUCEK, P., SVOBODOVA, B., POLESNY, Z., LANGROVA, I., SMRCEK, S., KOKOSKA, L. Antimicrobial activity of some medicinal barks used in Peruvian Amazon. Journal of Ethnopharmacology, 111, 427-429, 2007.

KUGELMAN, M., LIU, W.C, AXELROD, M., MCBRIDE, T.J., RAO, K.V. Indicine-Noxide: the antitumor principle of *Heliotropium indicum*. Lloydia, 39 (2-3), 125-128, 1976.

LANIGAN, G.W. Metabolism of pyrrolizidine alklaoids in the ovine rumen. III The competitive relationship between heliotrine metabolism and methanogenesis in rumen fluid in vitro. Australian Journal of Agricultural Research, 22, 123-130, 1971.

LANIGAN, G.W., SMITH, L.W. Metabolism of pyrrolizidine alkaloids in the ovine rumen. Australian Journal of Agricultural Research, 21, 493-500, 1970.

- LEITE, J.P.V. Fitoterapia, Bases Científicas e Tecnológicas. Atheneu, p. 12-14, 2009.
- LIMA, B.G. Estudo fitoquímico e biológico de *Eugenia sulcata* Spring ex Mart. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, 2012.
- LIN, G., CUI, Y., HAWES, E.M. Microsomal formation of a pyrrolic alcohol glutathione conjugate of Clivorine firm evidence for the formation of a pyrrolic metabolite of an otonecine-type pyrrolizidine alkaloids. *Drug Metabolism and Disposition*, 26,181-184, 1998.
- LIU, F., WAN, S.Y., JIANG, Z., LI, S.F.Y., ONG, E.S., OSORIO, J.C.C. Determination of pyrrolizidine alkaloids in comfrey by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Talanta* 80, 916-923, 2009.
- LOGIE, C.G., GRUE, M.R., LIDDELL, J.R. Review: Proton NMR spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry*, 37, 43-109, 1994.
- LYON, A.W., MANSOOR, A. & TROTTER, M.J., Urinary gems: acyclovir crystalluria. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 126 (6), 753-754, 2002.
- MAAP/DGA - Ministério do Ambiente Agricultura e Pescas/Direcção Geral do Ambiente. Livro Branco sobre o Estado do Ambiente em Cabo Verde, 2004.
- MAGALHÃES, C.G. Estudo fitoquímico do tronco e raiz de *Maytenus salicifolia* Reissek (Celastraceae) e avaliação da atividade biológica de seus constituintes e de ésteres derivados do lupeol. Tese (Doutorado) - Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.
- MAHATO, S.B., KUNDU, A.P. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features, *Phytochemistry*, 37 (6), 1517-1575, 1994.
- MARSTON, A., KISSLING, J., HOSTETTMANN, K. A Rapid TLC Bioautographic Method for the Detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitors in Plants. *Phytochemical Analysis*, 13, 51-54, 2002.
- MARTINS, E.S. Flora de Cabo Verde. Plantas Vasculares 74, Boraginaceae. IICT/INIDA, Lisboa/Praia, 1995.
- MATOS, F.J.A. Introdução à Fitoquímica Experimental, 3ª Ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009.
- MATTOCKS, A. R. Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids; Academic Press: London, 1986.
- MATTSSON, J.L. Mixtures in the real world: The importance of plant self-defense toxicants, mycotoxins, and the human diet. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1-8, 2007.
- MÉDAIL, F., QUÉZEL, P. Biodiversity hotspots in the Mediterranean Basin: Setting global conservation priorities. *Conservation Biology*, 13, 1510-1513, 1999.

MEDINA, J. C. M. Estudo químico e biológico de espécies vegetais da família Boraginaceae (Gêneros *Heliotropium* e *Tournefortia*). Tese (Doutorado)- Programa de Pós-Graduação em Química. Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

MEHRABANI, M., GHANNADI, A., SAJJADI, E., GHASSEMI, N., SHAMS-ARDAKANI, M.R. Toxic pyrrolizidine alkaloids of *Echium amoenum* Fisch. & Mey. Daru, 14, 122-127, 2006.

MEHRABANI, M., GHASSEMI, N., SAJJADI, E., GHANNADI, A.R., SHAMS-ARDAKANI, M.R. Main phenolic compound of petals of *Echium amoenum* Fish and C.A.Mey, a famous medicinal plant of Iran. Daru, 13, 65-69, 2005a.

MEHRABANI, M., SHAMS-ARDAKANIB, M., GHANNADIC, A., DEHKORDIC, N.G., JAZIC, S.E.S. Production of Rosmarinic Acid in *Echium amoenum* Fisch. and C.A. Mey. Cell Cultures. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2, 111-115, 2005b.

MELLO, C.B., MENDONÇA-LOPES, D., FEDER, D., UZEDA, C.D., CARNEIRO, R.M., ROCHA, M.A., *et al.* Laboratory evaluation of the effects of triflumuron on the development of *Rhodnius prolixus* nymph. Memória Instituto Oswaldo Cruz, 103, 839-842, 2008.

MELLO, C.B., UZEDA, C.D., BERNARDINO, M.V., MENDONÇA-LOPES, C., KELECOM, A., FEVEREIRA, P.C.A., *et al.* Effects of the essential oil obtained from *Pilocarpus spicatus* on the development of *Rhodnius prolixus* nymphae. Revista Brasileira de Farmacognosia, 17, 514-520, 2007.

MELO, J.I.M. DE, SILVA, L.C. DA, STAPF, M.N.S., RANGA, N.T. *Boraginaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000064>).

MELO, J.I.M., LYRA-LEMOES, R.P. Sinopse taxonômica de Boraginaceae *sensu lato* A. Juss. no Estado de Alagoas, Brasil. Acta botânica brasileira, 22(3), 701-710, 2008.

MELO, J.I.M.; ANDRADE, W.M. *Boraginaceae s.l.* A. Juss. em uma área de Caatinga da ESEC Raso da Catarina, BA, Brasil. Acta botânica brasileira, 21 (2), 369-378, 2007.

MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; PAGANELLI, M.O.; CHAUD, M.V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 15 (4), 316-320, 2005.

MIRANDA, M.M.F.S. Viroses dermatópicas In: _____. Introdução a virologia humana, 1ª Ed. Guanabara Koogan, 7, 75-85, 2002.

MOLYNEUX, R.J., JOHNSON, A.E., OLSEN, J.D., BAKER, D.C. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids from Riddell groundsel (*Senecio riddellii*) to cattle. American Journal of Veterinary Research, 52, 146-151, 1991.

MORALES, R. Farmacología y Farmacognósia como Fuentes de Validación y Contraste en Etnobotánica. Monograf Jard. Bot. Córdoba, 3, 93-98, 1996.

MUKHERJEE, P.K., KUMAR, V., MAL, M., HOUGHTON, P.J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 14 (4), 289-300, 2007.

NAGAI, T., TANOUE, Y., KAI, N., SUZUKI, N. Functional Property of Honey from *Echium vulgare*. *Food and Nutrition Sciences*, 3, 614-620, 2012.

NCCLS - NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 8th ed. Approved standard M2-A8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, 2003.

NEYNDORFF, H.C., BARTEL, D.L., TUFARO F., LEVY, J.G. Development of a model to demonstrate photosensitizer-mediated viral inactivation in blood. *Transfusion*, 30 (6), 485-90, 1990.

NIGRA, L., HUXTABLE, R. J. Hepatic glutathione concentrations and the release of pyrrolic metabolites of the pyrrolizidine alkaloid, monocrotaline, from the isolated perfused liver. *Toxicon*, 30, 1195-1202, 1992.

NISHIMURA, T., TOKU, K., FUKUYASU, H. Antiviral compounds. XII. Antiviral activity of aminohydrazones of alkoxyphenyl substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and mice. *Kitasato Archives of Experimental Medicine*, 50, 39-46, 1977.

NOSTRO, A., GERMANÒ, M.P., D'ANGELO, V., MARINO, A., CANATELLI, M.A. Extration methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lettes in Applied Microbiology*, 30, 379-384, 2000.

OLIVEIRA, A.P. Metabólitos secundários e atividades antibacteriana e anticolinestarásica de *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) TD Penn. (Sapotaceae). Tese (Doutorado) – NPPN/UFRJ, 2011.

OMS - Organização Mundial da Saúde, Escritório Regional para a África. Década da medicina tradicional na região africana: relatório dos progressos. AFR/RC61/PR/2, 2011.

ORHAN, İ., ŞENOL, F.S., KOCA, U., ERCETİN, T., TOKER, G. Evaluation of the antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Arnebia densiflora* Ledeb. *Turkish Journal of Biology* 35, 111-115, 2011.

ORHAN, İ.E., OZCELÝK, B., KARTAL, M., KAN, Y., Antimicrobial and antiviral effects of essential oils from selected Umbelliferae and Labiatae plants and individual essential oil components. *Turkish Journal of Biology*, 36, 239-246, 2012.

PAIVA, J.A. Estudo fitoquímico em espécies do Gênero *Senecio* (Asterácia). Tese de Doutorado. Departamento de química orgânica, Universidade Estadual de Campinas, SP. T/UNICAMP, 2002.

PALAHÍ, M., MAVSAR, R., GRACIA, C., BIROT, Y. Mediterranean forests under focus. *International Forestry Review*, 10 (4), 2008.

PANTER, K.E., GARDNER, D.R., LEE, S.T., PFISTER, J.A., RALPHS, M.H., STEGELMEIER, B.L., JAMES, L.F. Important poisonous plants of the United States. In: _____. Poisonous Plants: Global Research and Solutions. First edition, 66, 825-872, 2007.

PAVIA, D.L., LAMPMAN, G.M., KRIZ, G.S., VYVYAN, J.R. Introdução à espectroscopia. Tradução da 4ª edição norte-americana. São Paulo, Cengage Learning, p.120, 170-172, 401-402; 458-463, 2012.

PEDERSEN, E., LARSEN, L. Mass spectrometry of some pyrrolizidine alkaloids. Organic Mass Spectrometry, 4, 249-261, 1970.

PENELLO, A.M., CAMPOSMARCELA, B.C. SIMÃO, S., GONÇALVES, M.A., SOUZA, P.M.T., SALLES, R.S. PELLEGRINI, E. Genital Herpes DST-Jornal brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis, 22 (2), 64-72, 2010.

PRAKASH, A.S., PEREIRA, T.N., REILLY, P.E.B., SEAWRIGHT, A.A. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. Mutation Research, 443, 53-67, 1999.

RABBANI, M., SAJJADI, S.E., VASEGHI, G., JAFARIAN, A. Anxiolytic effects of *Echium amoenum* on the elevated plus-maze model of anxiety in mice. Fitoterapia 75, 457-464, 2004.

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., FLOWER, R.J., *Rang & Dale Farmacologia* [Tradução da 6ª edição por Raymundo Rodrigues Santos] Elsevier, Rio de Janeiro, 2007.

RANJABAR, A., KHORAMI, S., SAFARABADI, M., SHAHMORADI, A., MALEKIRAD, A.A., VAKILIAN, K., *et al.* Antioxidant activity of Iranian *Echium amoenum* Fisch & C.A.Mey flower decoction in humans: A cross-sectional before/after clinical trail. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 3, 469-473, 2006.

REED, L.J., MÜENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. American Journal of Hygiene, 27 (3), 493-497, 1938.

REINA, M., GONZALEZ-COLOMA, A., GUTIERREZ, C., CABRERA, R., HENRIQUEZ, J., VILLARROEL, L. Bioactive Saturated Pyrrolizidine Alkaloids from *Heliotropium floridum*. Phytochimist, 46 (5), 845-853, 1997.

REINA, M., MERICLI, A. H., CABRERA, R., GONZALEZ-COLOMA, A. Pyrrolizidine Alkaloids from *Heliotropium bovei*. Phytochimist, 38 (2), 355-358, 1995.

RHEE, I.K., VAN DE MEENT, M., INGGANINAN, K., VEERPORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidacea using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. Journal of Chromatography A, 915, 217-223, 2001.

RODRIGUEZ, D.J., CHULIA, J., SIMÕES, C.M.O., AMOROS, M., MARIOTTE, A.M., GIRRE, L. Search for in vitro antiviral activity of a new isoflavonic glycoside from *Ulex europaeus*. Planta Medica, 56, 59-62, 1990.

ROEDER, E. Medicinal plants in China containing pyrrolizidine alkaloids. Pharmazie, 55, 711-726, 2000.

- ROEDER, E. Review: Carbon-13 NMR spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry*, 29 (1), 11-29, 1990.
- ROEDER, E., LIU, K., BOURAUDEL, T. Pyrrolizidine alkaloids from *Echium pininana*. *Phytochemistry*, 30 (9), 3107-3110, 1991.
- ROMEIRAS, M., ASCENSÃO, L., DUARTE, M., DINIZ, M., PAIS, M. Taxonomy of *Echium* (Boraginaceae) species from Cape Verde Islands. *Australian Systematic Botany*, 21, 26-38, 2008.
- ROMEIRAS, M.M., PAULO, O.S., DUARTE, M.C., PINA-MARTINS, F., COTRIM, M.H., CARINE, M.A., PAIS, M.S. Origin and diversification of the genus *Echium* (Boraginaceae) in the Cape Verde archipelago. *Taxon*, 60 (5), 1375-1385, 2011.
- ROQUE, S., DUARTE, I., GRAZIANE, P., NASCIMENTO, M.A., RAMOS, N. *Usos Medicinais e Tradicionais da Flora Endêmica, Indígena e Exótica do Monte Gordo*. Ministério do Ambiente e da Agricultura, Direção Geral do Ambiente, Projeto Áreas Protegidas – Parque Natural Monte Gordo, São Nicolau. República de Cabo Verde, 2008.
- ROQUE-ALBELO, L., SCHROEDER, F.C., CONNER, W.E., BEZZERIDES, A., HOEBEKE, E.R., MEINWALD, J., EISNER, T. Chemical defense and aposematism: the case of *Utetheisa galapagensis*. *Chemoecology*, 12, 153-157, 2002.
- SAITO, M.L, OLIVEIRA, F. Características físicas e químicas do extrato fluido de *Cordia ecalyculata* Vell - Boraginaceae. *Revista Brasileira de farmacognosia* [online], 1 (1), 3-11. ISSN 0102-695X, 1986.
- SANTANA, O., REINA, M., FRAGA, B.M., SANZ, J., GONZÁLEZ-COLOMA, A. Antifeedant activity of fatty acid esters and phytosterols from *Echium wildpretii*. *Chemistry & Biodiversity*, 9 (3), 567-576, 2012.
- SANTOS, N.P., PINTO, A.C. “A Mata é sua Farmácia”- A Pesquisa de Plantas Brasileiras para o Combate de Doenças Tropicais no Século XIX. *Revista Virtual de Química*, 4 (2), 162-172, 2012.
- SCHEMELLER, T., EL-SHAZLY, A., WINK, M. Allelochemical activities of pyrrolizidine alkaloids: interactions with neuroreceptors and acetylcholine related enzymes. *Journal of Chemical Ecology*, 23, 2, 1997.
- SERENIKI, A., VITAL, M.A.B.F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. *Revista Psiquiatria RS*, 30, 1, 2008.
- SHIOJIMA, K., ARAI, Y., MASUDA, K., TAKASE, Y., AGETA, t., AGETA H., Mass Spectra of pentacyclic triterpenoids. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 40 (7), 1683-1690, 1992.
- SILVA, S.R.S. Estudo químico e avaliação do potencial farmacológico e herbicida de *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek. Tese (Doutorado) - Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

SINGH, B., SAHU, P. M., SINGH, S. Antimicrobial activity of pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium subulatum*. *Fitoterapia* 73: 153-155, 2002.

SKALTSA, H.D., DEMETZOS, C., LAZARI, D., SOKOVIC, M. Essential Oil analysis and antimicrobial activity of eight stachys species from Greece. *Phytochemistry*, 64, 743-752, 2003.

SMART, D.J., AHMEDI, K.P., HARVEY, J.S., LYNCH, A.M. Genotoxicity screening via the γ H2AX by flow assay. *Mutation Research*, 715, 25-31, 2011.

SMITH, L.W., CULVENOR, C.C. Plant sources of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Natural Products*, 44, 129-152, 1981.

SOUZA, G.H.B., MELLO, J.C.P., LOPES, N.P. *Farmacognosia: coletânia científica*. Ed. UFOP, 2012.

SPERLING, P., LIBISCH, B., ZAHRINGER, U. Functional identification of a delta 8 sphingolipid desaturase from *borago officinalis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 388, 293-8, 2001.

STANISÇUASKI, F., FERREIRA-DA-SILVA, C.T., MULINARI, F., PIRES-ALVES, M., CARLINI, C.R. Effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon*, 45, 753-760, 2005.

STEGELMEIER, B.L., EDGAR, J.A., COLEGATE, S.M., GARDNER, D.R., SCHOCH, T.K. Pyrrolizidine alkaloid plants, metabolism and toxicity. *Journal of Natural Toxins*, 8, 95-116, 1999.

SUTER, W. Predictive value of in vitro safety studies. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10, 362-366, 2006.

THE PLANT LIST, 2010. Version 1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (acessado em 28 de Fevereiro de 2012).

TOMA, W., TRIGO, J.R., PAULA, A.C.B., BRITO, A.R.M. S. Preventive activity of pyrrolizidine alkaloids from *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) on gastric and duodenal induced ulcer on mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 345-351, 2004.

TRAMIL, *Farmacopea Vegetal Caribeña*, 2005.

VAN DEN BERG, S.J.P.L., RESTANI, P., BOERSMA, M.G., DELMULLE, L., RIETJENS, I.M.C.M. Levels of Genotoxic and Carcinogenic Compounds in Plant Food Supplements and Associated Risk Assessment. *Food and Nutrition Sciences*, 2, 989-1010, 2011.

VENDRUSCOLO, G.S., RATES, S.M.K., MENTZ, L.A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Revista brasileira de farmacognosia*, 15 (4), 361-372, 2005.

VIEIRA, P.C., MAFEZOLI, J., BIAVATTI, M.W. Inseticidas de origem vegetal, In A.G. Corrêa & P.C. Vieira (eds.), Produtos naturais no controle de insetos. São Carlos, EdUFSCar, 105-120, 2007.

WAGNER, H. & BLADT, S. *Plant Drug Analysis*. Berlin: Springer-Verlag, 1996.

WIEDENFELD, H., EDGAR, J. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to humans and ruminants. *Phytochemistry Reviews*, 10, 137-151, 2011.

WITTE, L., RUBIOLO, P., BICCHI, C., HARTMANN, T. Comparative analysis of pyrrolizidine alkaloids from natural sources by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Phytochemistry*, 32 (1), 187-196, 1993.

YANG, Y.C., CROWDER, J., WARDLE, N.J., YANG, L., WHITE, K.N., WANG, Z.T., BLIGH, S.W. A. ¹H NMR study of monocrotaline and its metabolites in human blood. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2793-2799, 2011.

ZAMANSOLTANI, F., NASSIRI-ASL, M., KARIMI, R., MAMAGHANI-RAD, P. Hepatotoxicity effects of aqueous extract of *Echium amoenum* in rats. *Pharmacologyonline*, 1, 432-438, 2008.

ZEHENTBAUER, G., & REINECCIUS, G.A. Determination of key aroma components of cheddar using dynamic headspace dilution spray. *Flavour and Fragrance Journal*, 17, 300-305, 2002.

ZHANG, Z., WANG, X., CHEN, Q., SHU, L., WANG, J., SHAN, G. Clinical efficacy and safety of huperzine Alpha in treatment of mild to moderate Alzheimer disease, a placebo-controlled, double-blind, randomized trial. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 82 (14), 941-4, 2002.